

## TRAITE : COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS

PCT

## NOTIFICATION D'ELECTION

(règle 61.2 du PCT)

Expéditeur: le BUREAU INTERNATIONAL

Destinataire:

Commissioner  
 US Department of Commerce  
 United States Patent and Trademark  
 Office, PCT  
 2011 South Clark Place Room  
 CP2/5C24  
 Arlington, VA 22202  
 ETATS-UNIS D'AMERIQUE  
 en sa qualité d'office élu

Date d'expédition (jour/mois/année) 21 décembre 2000 (21.12.00)	
Demande internationale no PCT/FR00/01259	Référence du dossier du déposant ou du mandataire 340833/18162
Date du dépôt international (jour/mois/année) 10 mai 2000 (10.05.00)	Date de priorité (jour/mois/année) 10 mai 1999 (10.05.99)
Déposant HIRSCH, François etc	

1. L'office désigné est avisé de son élection qui a été faite:



dans la demande d'examen préliminaire international présentée à l'administration chargée de l'examen préliminaire international le:

04 décembre 2000 (04.12.00)



dans une déclaration visant une élection ultérieure déposée auprès du Bureau international le:

2. L'élection



a été faite



n'a pas été faite

avant l'expiration d'un délai de 19 mois à compter de la date de priorité ou, lorsque la règle 32 s'applique, dans le délai visé à la règle 32.2b).

Bureau international de l'OMPI 34, chemin des Colombettes 1211 Genève 20, Suisse no de télécopieur: (41-22) 740.14.35	Fonctionnaire autorisé Maria Kirchner no de téléphone: (41-22) 338.83.38
--	--

## TRAITÉ DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS

PCT

NOTIFICATION DE L'ENREGISTREMENT  
D'UN CHANGEMENT(règle 92bis.1 et  
instruction administrative 422 du PCT)

Expéditeur: le BUREAU INTERNATIONAL

Destinataire:

MARTIN, Jean-Jacques  
Cabinet Régimbeau  
20, rue de Chazelles  
F-75847 Paris Cedex 17  
FRANCE

Date d'expédition (jour/mois/année) 08 mars 2001 (08.03.01)	NOTIFICATION IMPORTANTE
Référence du dossier du déposant ou du mandataire 340833/18162	
Demande internationale no PCT/FR00/01259	Date du dépôt international (jour/mois/année) 10 mai 2000 (10.05.00)

## 1. Les renseignements suivants étaient enregistrés en ce qui concerne:

☐ le déposant      ☐ l'inventeur      ☒ le mandataire      ☐ le représentant commun

Nom et adresse MARTIN, Jean-Jacques Cabinet Régimbeau 26, avenue Kléber F-75116 Paris FRANCE	Nationalité (nom de l'Etat)	Domicile (nom de l'Etat)
	no de téléphone 01 45 00 92 02	
	no de télécopieur 01 45 00 46 12	
	no de téléimprimeur	

## 2. Le Bureau international notifie au déposant que le changement indiqué ci-après a été enregistré en ce qui concerne:

☐ la personne      ☐ le nom      ☒ l'adresse      ☐ la nationalité      ☐ le domicile

Nom et adresse MARTIN, Jean-Jacques Cabinet Régimbeau 20, rue de Chazelles F-75847 Paris Cedex 17 FRANCE	Nationalité (nom de l'Etat)	Domicile (nom de l'Etat)
	no de téléphone 01 44 29 35 00	
	no de télécopieur 01 44 29 35 99	
	no de téléimprimeur	

## 3. Observations complémentaires, le cas échéant:

## 4. Une copie de cette notification a été envoyée:

☒ à l'office récepteur      ☒ aux offices désignés concernés  
☐ à l'administration chargée de la recherche internationale      ☐ aux offices élus concernés  
☐ à l'administration chargée de l'examen préliminaire international      ☐ autre destinataire:

Bureau international de l'OMPI 34, chemin des Colombettes 1211 Genève 20, Suisse no de télécopieur (41-22) 740.14.35	Fonctionnaire autorisé: Jocelyne Rey-Millet no de téléphone (41-22) 338.83.38
---	---

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Intern 1al Application No

PCT/FR 00/01259

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**  
IPC 7 C12N15/87 A61K48/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

**B. FIELDS SEARCHED**

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
IPC 7 A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

WPI Data, PAJ, EPO-Internal, BIOSIS

**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 96 13599 A (WELS WINFRIED ; FOMINAYA JESUS (CH)) 9 May 1996 (1996-05-09) cited in the application	1, 12, 14, 28-30, 32, 36, 37, 40-42, 45, 47-50, 53-56, 58-63
Y	page 2, paragraph 1 - page 6, paragraph 1  page 7, paragraph 2 page 10, paragraphs 1, 2 page 20, paragraphs 1, 2	2-11, 13, 15-19, 26, 27, 31, 33-35, 38, 39, 51, 52, 57
	-/--	

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

\* Special categories of cited documents:

- \*A\* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- \*E\* earlier document but published on or after the international filing date
- \*L\* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- \*O\* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- \*P\* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- \*T\* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- \*X\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- \*Y\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- \*Z\* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

12 December 2000

Date of mailing of the international search report

27/12/2000

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Sitch, W

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Intern      1al Application No

PCT/FR 00/01259

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>page 20, paragraph 4 -page 21, paragraph 1            ----            FOMINAYA J ET AL: "Target cell-specific DNA transfer mediated by a chimeric multidomain protein. Novel non-viral gene delivery system."            JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, (1996 MAY 3) 271 (18) 10560-8.,            XP002133110            cited in the application</p>	<p>1,12,14,            28-30,            32,36,            37,            40-42,            45,            47-50,            53-56,            58-63</p>
Y	<p>page 10560</p>	<p>2-11,13,            15-19,            26,27,            31,            33-35,            38,39,            51,52,57</p>
X	<p>abstract            page 10562; figure 1            ----            WO 94 13325 A (MICROPROBE CORP)            23 June 1994 (1994-06-23)</p>	<p>20-25,            28,36,            37,40,            49,50,            53-56,            58-63</p>
Y	<p>page 4, line 19 -page 5, line 19</p>	<p>2-11,13,            15-19,            26,27,            31,            33-35,            38,39</p>
X	<p>page 7, line 17 -page 11, line 33            page 25, line 6 -page 26, line 26            ----            CHAKRABARTI, M. ET AL: "Transfer of DNA into lymphoma cells by DNA-bound to T101-biotinylated -avidin- polylysine antibody complex."            JOURNAL OF NUCLEAR MEDICINE, (1996) VOL. 37, NO. 5 SUPPL., PP. 62P. MEETING INFO.: 43RD ANNUAL MEETING OF THE SOCIETY OF NUCLEAR MEDICINE DENVER, COLORADO, USA JUNE 3-5, 1996,            XP002133111            abstract No. 237            ----            -/--</p>	<p>14,28,            36,37,            40-44,            49,50,            53-56,            58-63</p>



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Intern 1al Application No

PCT/FR 00/01259

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>DATABASE MEDLINE 'Online!  US NATIONAL LIBRARY OF MEDICINE (NLM),  BETHESDA, MD, US;  GUY J ET AL: "Delivery of DNA into  mammalian cells by receptor-mediated  endocytosis and gene therapy."  retrieved from STN  Database accession no. 96031841  XP002133112  abstract  &amp; MOLECULAR BIOTECHNOLOGY, (1995 JUN) 3  (3) 237-48. REF: 60,</p>	<p>14,28,  36,37,  40-46,  49,50,  53-56,  58-63</p>
Y	<p>WO 88 08854 A (OOSTERWIJK EGBERT ;WARNAAR  SVEN O (NL)) 17 November 1988 (1988-11-17)  cited in the application  page 2, paragraph 1 -page 3, paragraph 4</p>	<p>51,52,57</p>
A	<p>WO 95 21195 A (DONATO NICHOLAS J  ;ROSENBLUM MICHAEL G (US); RES DEV  FOUNDATION (U) 10 August 1995 (1995-08-10)  page 3, line 26 -page 6, line 11</p>	<p>4</p>
A	<p>WO 98 56425 A (DUNCAN RUTH ;SATCHI RONIT  (GB); UNIV LONDON PHARMACY (GB))  17 December 1998 (1998-12-17)  page 3, line 36 -page 4, line 12  page 7, line 17 -page 11, line 14</p>	<p>2</p>
A	<p>WO 98 47538 A (WRASIDLO WOLFGANG ;LICH  KAI (DE); RIEFKE BJOERN (DE); DIAGNOSTIKF)  29 October 1998 (1998-10-29)  claims 1,8</p>	<p>2</p>
A	<p>DATABASE BIOSIS 'Online!  BIOSCIENCES INFORMATION SERVICE,  PHILADELPHIA, PA, US; 1995  TRAUT ROBERT R ET AL: "Location and domain  structure of Escherichia coli ribosomal  protein L7/L12: Site specific cysteine  cross-linking and attachment of  fluorescent probes."  Database accession no. PREV199698797154  XP002155195  abstract  &amp; BIOCHEMISTRY AND CELL BIOLOGY,  vol. 73, no. 11-12, 1995, pages 949-958,  ISSN: 0829-8211</p>	<p>3</p>
	-/--	

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Interr. Natl Application No  
PCT/FR 00/01259

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>DATABASE BIOSIS 'Online! BIOSCIENCES INFORMATION SERVICE, PHILADELPHIA, PA, US; 1990 HUCKETT B ET AL: "EVIDENCE FOR TARGETED GENE TRANSFER BY RECEPTOR-MEDIATED ENDOCYTOSIS STABLE EXPRESSION FOLLOWING INSULIN-DIRECTED ENTRY OF NEO INTO HEPG2 CELLS" Database accession no. PREV199090077976 XP002155196 abstract &amp; BIOCHEMICAL PHARMACOLOGY, vol. 40, no. 2, 1990, pages 253-264, ISSN: 0006-2952</p>	3
A	<p>PONCET ET AL: "ANTIFECTION: AN ANTIBODY-MEDIATED METHOD TO INTRODUCE GENES INTO LYMPHOID CELLS IN VITRO AND IN VIVO" GENE THERAPY, vol. 3, 1996, pages 731-738, XP000877306 cited in the application page 736 page 5</p>	3
A	<p>US 5 428 132 A (HIRSCH FRANCOIS ET AL) 27 June 1995 (1995-06-27) cited in the application column 2 -column 4; example 1</p>	3
A	<p>WO 98 02564 A (JOHN P ROBARTS RESEARCH INST ;STRATHDEE CRAIG A (CA)) 22 January 1998 (1998-01-22) claims 1,16,32,33,37,38</p>	39
A	<p>US 5 166 320 A (WU GEORGE Y ET AL) 24 November 1992 (1992-11-24) page 3, line 25 -page 4, line 51</p>	45,46
A	<p>WO 94 04696 A (MILES INC) 3 March 1994 (1994-03-03) cited in the application page 4, line 24 -page 8, line 18 figures 4-6</p>	

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Intern. 1st Application No

PCT/FR 00/01259

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9613599 A	09-05-1996	AU 695196 B AU 3926895 A EP 0789776 A JP 9511916 T NZ 295673 A	06-08-1998 23-05-1996 20-08-1997 02-12-1997 29-03-1999
WO 9413325 A	23-06-1994	US 5574142 A AU 6295394 A	12-11-1996 04-07-1994
WO 8808854 A	17-11-1988	EP 0366707 A	09-05-1990
WO 9521195 A	10-08-1995	AU 695564 B AU 1868795 A CN 1143374 A EP 0743958 A FI 963103 A JP 9508792 T NO 963283 A	13-08-1998 21-08-1995 19-02-1997 27-11-1996 01-10-1996 09-09-1997 06-08-1996
WO 9856425 A	17-12-1998	AU 8028298 A CN 1259875 T EP 0989864 A	30-12-1998 12-07-2000 05-04-2000
WO 9847538 A	29-10-1998	DE 19717904 A AU 7905798 A CN 1253507 T EP 0988060 A NO 995181 A	29-10-1998 13-11-1998 17-05-2000 29-03-2000 22-10-1999
US 5428132 A	27-06-1995	NONE	
WO 9802564 A	22-01-1998	AU 3332097 A	09-02-1998
US 5166320 A	24-11-1992	US 5635383 A US 5874297 A JP 2731844 B JP 63269985 A	03-06-1997 23-02-1999 25-03-1998 08-11-1988
WO 9404696 A	03-03-1994	AU 674026 B AU 5088593 A CA 2143308 A EP 0658210 A FI 950866 A JP 8504565 T NO 950726 A NZ 255870 A ZA 9306189 A	05-12-1996 15-03-1994 03-03-1994 21-06-1995 24-04-1995 21-05-1996 18-04-1995 25-09-1996 10-01-1995

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Dema Internationale No

PCT/FR 00/01259

**A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE**  
CIB 7 C12N15/87 A61K48/00

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

**B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE**

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 7 A61K

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

WPI Data, PAJ, EPO-Internal, BIOSIS

**C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS**

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	WO 96 13599 A (WELS WINFRIED ; FOMINAYA JESUS (CH)) 9 mai 1996 (1996-05-09) cité dans la demande	1, 12, 14, 28-30, 32, 36, 37, 40-42, 45, 47-50, 53-56, 58-63
Y	page 2, alinéa 1 - page 6, alinéa 1  page 7, alinéa 2 page 10, alinéas 1, 2 page 20, alinéas 1, 2	2-11, 13, 15-19, 26, 27, 31, 33-35, 38, 39, 51, 52, 57

-/--

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

\* Catégories spéciales de documents cités:

- \*A\* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- \*E\* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- \*L\* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- \*O\* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- \*P\* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- \*T\* document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- \*X\* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- \*Y\* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- \*Z\* document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

12 décembre 2000

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

27/12/2000

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale

Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Sitch, W

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Dema Internationale No  
PCT/FR 00/01259

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	<p>page 20, alinéa 4 -page 21, alinéa 1 ----</p> <p>FOMINAYA J ET AL: "Target cell-specific DNA transfer mediated by a chimeric multidomain protein. Novel non-viral gene delivery system." JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, (1996 MAY 3) 271 (18) 10560-8., XP002133110 cité dans la demande</p>	<p>1,12,14, 28-30, 32,36, 37, 40-42, 45, 47-50, 53-56, 58-63</p>
Y	<p>page 10560</p>	<p>2-11,13, 15-19, 26,27, 31, 33-35, 38,39, 51,52,57</p>
X	<p>abrégé page 10562; figure 1 ----</p> <p>WO 94 13325 A (MICROP BE CORP) 23 juin 1994 (1994-06-23)</p>	<p>20-25, 28,36, 37,40, 49,50, 53-56, 58-63</p>
Y	<p>page 4, ligne 19 -page 5, ligne 19</p>	<p>2-11,13, 15-19, 26,27, 31, 33-35, 38,39</p>
X	<p>page 7, ligne 17 -page 11, ligne 33 page 25, ligne 6 -page 26, ligne 26 ----</p> <p>CHAKRABARTI, M. ET AL: "Transfer of DNA into lymphoma cells by DNA-bound to T101-biotinylated -avidin- polylysine antibody complex." JOURNAL OF NUCLEAR MEDICINE, (1996) VOL. 37, NO. 5 SUPPL., PP. 62P. MEETING INFO.: 43RD ANNUAL MEETING OF THE SOCIETY OF NUCLEAR MEDICINE DENVER, COLORADO, USA JUNE 3-5, 1996, XP002133111 abstract No. 237 ----- -/--</p>	<p>14,28, 36,37, 40-44, 49,50, 53-56, 58-63</p>

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Dema Internationale No  
PCT/FR 00/01259

## C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	<p>DATABASE MEDLINE 'en ligne! US NATIONAL LIBRARY OF MEDICINE (NLM), BETHESDA, MD, US; GUY J ET AL: "Delivery of DNA into mammalian cells by receptor-mediated endocytosis and gene therapy." retrieved from STN Database accession no. 96031841 XP002133112 abrégé &amp; MOLECULAR BIOTECHNOLOGY, (1995 JUN) 3 (3) 237-48. REF: 60,</p> <p style="text-align: center;">---</p>	<p>14,28, 36,37, 40-46, 49,50, 53-56, 58-63</p>
Y	<p>WO 88 08854 A (OOSTERWIJK EGBERT ;WARNAAR SVEN O (NL)) 17 novembre 1988 (1988-11-17) cité dans la demande page 2, alinéa 1 -page 3, alinéa 4</p> <p style="text-align: center;">---</p>	<p>51,52,57</p>
A	<p>WO 95 21195 A (DONATO NICHOLAS J ;ROSENBLUM MICHAEL G (US); RES DEV FOUNDATION (U) 10 août 1995 (1995-08-10) page 3, ligne 26 -page 6, ligne 11</p> <p style="text-align: center;">---</p>	<p>4</p>
A	<p>WO 98 56425 A (DUNCAN RUTH ;SATCHI RONIT (GB); UNIV LONDON PHARMACY (GB)) 17 décembre 1998 (1998-12-17) page 3, ligne 36 -page 4, ligne 12 page 7, ligne 17 -page 11, ligne 14</p> <p style="text-align: center;">---</p>	<p>2</p>
A	<p>WO 98 47538 A (WRASIDLO WOLFGANG ;LICH KAI (DE); RIEFKE BJOERN (DE); DIAGNOSTIKF) 29 octobre 1998 (1998-10-29) revendications 1,8</p> <p style="text-align: center;">---</p>	<p>2</p>
A	<p>DATABASE BIOSIS 'en ligne! BIOSCIENCES INFORMATION SERVICE, PHILADELPHIA, PA, US; 1995 TRAUT ROBERT R ET AL: "Location and domain structure of Escherichia coli ribosomal protein L7/L12: Site specific cysteine cross-linking and attachment of fluorescent probes." Database accession no. PREV199698797154 XP002155195 abrégé &amp; BIOCHEMISTRY AND CELL BIOLOGY, vol. 73, no. 11-12, 1995, pages 949-958, ISSN: 0829-8211</p> <p style="text-align: center;">---</p>	<p>3</p>
	<p>---</p> <p>---/---</p>	

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Dema      Internationale No  
PCT/FR 00/01259

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	<p>DATABASE BIOSIS 'en ligne! BIOSCIENCES INFORMATION SERVICE, PHILADELPHIA, PA, US; 1990 HUCKETT B ET AL: "EVIDENCE FOR TARGETED GENE TRANSFER BY RECEPTOR-MEDIATED ENDOCYTOSIS STABLE EXPRESSION FOLLOWING INSULIN-DIRECTED ENTRY OF NEO INTO HEPG2 CELLS" Database accession no. PREV199090077976 XP002155196 abrégé &amp; BIOCHEMICAL PHARMACOLOGY, vol. 40, no. 2, 1990, pages 253-264, ISSN: 0006-2952</p> <p style="text-align: center;">---</p>	3
A	<p>PONCET ET AL: "ANTIFECTION: AN ANTIBODY-MEDIATED METHOD TO INTRODUCE GENES INTO LYMPHOID CELLS IN VITRO AND IN VIVO" GENE THERAPY, vol. 3, 1996, pages 731-738, XP000877306 cité dans la demande page 736 page 5</p> <p style="text-align: center;">---</p>	3
A	<p>US 5 428 132 A (HIRSCH FRANCOIS ET AL) 27 juin 1995 (1995-06-27) cité dans la demande colonne 2 -colonne 4; exemple 1</p> <p style="text-align: center;">---</p>	3
A	<p>WO 98 02564 A (JOHN P ROBARTS RESEARCH INST ;STRATHDEE CRAIG A (CA)) 22 janvier 1998 (1998-01-22) revendications 1,16,32,33,37,38</p> <p style="text-align: center;">---</p>	39
A	<p>US 5 166 320 A (WU GEORGE Y ET AL) 24 novembre 1992 (1992-11-24) page 3, ligne 25 -page 4, ligne 51</p> <p style="text-align: center;">---</p>	45,46
A	<p>WO 94 04696 A (MILES INC) 3 mars 1994 (1994-03-03) cité dans la demande page 4, ligne 24 -page 8, ligne 18 figures 4-6</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	



# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Dema Internationale No

PCT/FR 00/01259

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 9613599 A	09-05-1996	AU 695196 B AU 3926895 A EP 0789776 A JP 9511916 T NZ 295673 A	06-08-1998 23-05-1996 20-08-1997 02-12-1997 29-03-1999
WO 9413325 A	23-06-1994	US 5574142 A AU 6295394 A	12-11-1996 04-07-1994
WO 8808854 A	17-11-1988	EP 0366707 A	09-05-1990
WO 9521195 A	10-08-1995	AU 695564 B AU 1868795 A CN 1143374 A EP 0743958 A FI 963103 A JP 9508792 T NO 963283 A	13-08-1998 21-08-1995 19-02-1997 27-11-1996 01-10-1996 09-09-1997 06-08-1996
WO 9856425 A	17-12-1998	AU 8028298 A CN 1259875 T EP 0989864 A	30-12-1998 12-07-2000 05-04-2000
WO 9847538 A	29-10-1998	DE 19717904 A AU 7905798 A CN 1253507 T EP 0988060 A NO 995181 A	29-10-1998 13-11-1998 17-05-2000 29-03-2000 22-10-1999
US 5428132 A	27-06-1995	AUCUN	
WO 9802564 A	22-01-1998	AU 3332097 A	09-02-1998
US 5166320 A	24-11-1992	US 5635383 A US 5874297 A JP 2731844 B JP 63269985 A	03-06-1997 23-02-1999 25-03-1998 08-11-1988
WO 9404696 A	03-03-1994	AU 674026 B AU 5088593 A CA 2143308 A EP 0658210 A FI 950866 A JP 8504565 T NO 950726 A NZ 255870 A ZA 9306189 A	05-12-1996 15-03-1994 03-03-1994 21-06-1995 24-04-1995 21-05-1996 18-04-1995 25-09-1996 10-01-1995

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

09/925493  
Translation

## PCT

## INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference 340833/18162	<b>FOR FURTHER ACTION</b> See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/FR00/01259	International filing date (day/month/year) 10 May 2000 (10.05.00)	Priority date (day/month/year) 10 May 1999 (10.05.99)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC C12N 15/87		
Applicant CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE (CNRS)		

1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.
2. This REPORT consists of a total of <u>14</u> sheets, including this cover sheet.  <input type="checkbox"/> This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).  These annexes consist of a total of _____ sheets.
3. This report contains indications relating to the following items:  I <input checked="" type="checkbox"/> Basis of the report II <input checked="" type="checkbox"/> Priority III <input type="checkbox"/> Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability IV <input checked="" type="checkbox"/> Lack of unity of invention V <input checked="" type="checkbox"/> Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement VI <input type="checkbox"/> Certain documents cited VII <input type="checkbox"/> Certain defects in the international application VIII <input checked="" type="checkbox"/> Certain observations on the international application

Date of submission of the demand 04 December 2000 (04.12.00)	Date of completion of this report 23 August 2001 (23.08.2001)
Name and mailing address of the IPEA/EP	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

## INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/FR00/01259

## I. Basis of the report

1. With regard to the **elements** of the international application:\*

- ☐ the international application as originally filed
- ☒ the description:  
pages 1-29, as originally filed  
pages \_\_\_\_\_, filed with the demand  
pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_
- ☒ the claims:  
pages 1-63, as originally filed  
pages \_\_\_\_\_, as amended (together with any statement under Article 19  
pages \_\_\_\_\_, filed with the demand  
pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_
- ☒ the drawings:  
pages 1/7-7/7, as originally filed  
pages \_\_\_\_\_, filed with the demand  
pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_
- ☐ the sequence listing part of the description:  
pages \_\_\_\_\_, as originally filed  
pages \_\_\_\_\_, filed with the demand  
pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_

2. With regard to the **language**, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which the international application was filed, unless otherwise indicated under this item.

These elements were available or furnished to this Authority in the following language \_\_\_\_\_ which is:

- ☐ the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rule 23.1(b)).
- ☐ the language of publication of the international application (under Rule 48.3(b)).
- ☐ the language of the translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rule 55.2 and/or 55.3).

3. With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, the international preliminary examination was carried out on the basis of the sequence listing:

- ☐ contained in the international application in written form.
- ☐ filed together with the international application in computer readable form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in written form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in computer readable form.
- ☐ The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.
- ☐ The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.

4. ☐ The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages \_\_\_\_\_
- ☐ the claims, Nos. \_\_\_\_\_
- ☐ the drawings, sheets/fig \_\_\_\_\_

5. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).\*\*

\* Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report since they do not contain amendments (Rule 70.16 and 70.17).

\*\* Any replacement sheet containing such amendments must be referred to under item 1 and annexed to this report.

**THIS PAGE BLANK (USPIC,**

# INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/FR00/01259

## II. Priority

1. ☐ This report has been established as if no priority had been claimed due to the failure to furnish within the prescribed time limit the requested:  

☐ copy of the earlier application whose priority has been claimed.  
☐ translation of the earlier application whose priority has been claimed.
2. ☐ This report has been established as if no priority had been claimed due to the fact that the priority claim has been found invalid.

Thus for the purposes of this report, the international filing date indicated above is considered to be the relevant date.

3. Additional observations, if necessary:

**SEE SEPARATE SHEET**

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



# INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/FR 00/01259

## Supplemental Box

(To be used when the space in any of the preceding boxes is not sufficient)

Continuation of: II.

The applicant's attention is drawn to the fact that the priority document of the present application does not refer to the use of a "peptide cleavable by one or more glycolytic and/or proteolytic enzymes". All the claims directed to a conjugate including such a peptide do not therefore enjoy the priority date of 10.05.99.

**THIS PAGE BLANK (USP 16)**

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/FR00/01259

IV. Lack of unity of invention

1. In response to the invitation to restrict or pay additional fees the applicant has:

- ☐ restricted the claims.
- ☐ paid additional fees.
- ☐ paid additional fees under protest.
- ☐ neither restricted nor paid additional fees.

2. ☒ This Authority found that the requirement of unity of invention is not complied with and chose, according to Rule 68.1, not to invite the applicant to restrict or pay additional fees.

3. This Authority considers that the requirement of unity of invention in accordance with Rules 13.1, 13.2 and 13.3 is

- ☐ complied with.
- ☒ not complied with for the following reasons:

**SEE SEPARATE SHEET**

4. Consequently, the following parts of the international application were the subject of international preliminary examination in establishing this report:

- ☒ all parts.
- ☐ the parts relating to claims Nos. \_\_\_\_\_

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

**Supplemental Box**

(To be used when the space in any of the preceding boxes is not sufficient)

Continuation of: IV

Pursuant to PCT Rule 13, an international application shall relate to one invention only or to a group of inventions so linked as to form a single general inventive concept, i.e. a group of inventions having at least one common technical feature forming a contribution over the prior art.

The International Preliminary Examining Authority has identified the following groups of inventions in the present application:

- A. Claims 1 and 29 (in whole) and 2-13, 26-33, 36-63 (in part) refer to conjugates for transferring a nucleic acid molecule, characterised in that they include a nucleic acid molecule, a translocation domain and an antibody specific for a surface antigen of said cell, and optionally a peptide cleavable by one or more glycolytic and/or proteolytic enzymes and/or an avidin-type molecule and/or a nucleic acid binding molecule.
- B. Claims 14 (in whole) and 9-13, 15-19, 24-28, 30-63 (in part) refer to conjugates for transferring a nucleic acid molecule in a cell, characterised in that they include a nucleic acid molecule, an antibody specific for a surface antigen of said cell and a nucleic acid binding molecule, and optionally a peptide cleavable by one or more glycolytic and/or proteolytic enzymes and/or an avidin-type molecule.

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

**Supplemental Box**

(To be used when the space in any of the preceding boxes is not sufficient)

Continuation of: IV

- C. Claims 20-23 (in whole) and 2-3, 5-11, 13, 15-28, 31, 33-63 (in part) refer to conjugates for transferring a nucleic acid molecule in a cell, characterised in that they include a nucleic acid molecule, an antibody specific for a surface antigen of said cell and a peptide cleavable by one or more glycolytic and/or proteolytic enzymes and optionally an avidin-type molecule and/or a nucleic acid binding molecule and/or a translocation domain.

The single inventive concept linking the various groups mentioned above is a conjugate for transferring a nucleic acid molecule in a cell, characterised in that it includes a nucleic acid molecule, an antibody specific for a surface antigen of said cell and at least one other molecule. Since this common concept is neither novel (see V.3) nor inventive (see V.4), the different groups mentioned above constitute independent inventions.

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



# INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.  
PCT/FR 00/01259

## V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

### 1. Statement

Novelty (N)	Claims	2-13, 15-19, 21-35, 39, 45-48, 51-52	YES
	Claims	1, 14, 20, 36-38, 40-44, 49-50, 53-63	NO
Inventive step (IS)	Claims		YES
	Claims	1-63	NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-63	YES
	Claims		NO

### 2. Citations and explanations

1. The present application refers to conjugates for transferring a nucleic acid molecule to a cell, characterised in that they include a nucleic acid molecule, an antibody specific for a surface antigen of said cell and at least one other molecule selected from: a translocation domain, a nucleic acid binding molecule or a peptide cleavable by a glycolytic and/or proteolytic enzyme. The application also refers to the use of said conjugates in the production of drugs.

#### 2. Reference is made to the following documents:

D1: WO-A-96 13599 (WELS WINFRIED; FOMINAYA JESUS (CH)), 9 May 1996 (1996-05-09), cited in the application.

D2: FOMINAYA J ET AL: 'Target cell-specific DNA transfer mediated by a chimeric multidomain protein. Novel non-viral gene delivery system'. JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY (1996 MAY 3) 271 (18) 10560-8, cited in the application.

D3: WO-A-94 13325A (MICROPROBE CORP) 23 June 1994

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

(1994-06-23)

D4: CHAKRABARTI M ET AL: 'Transfer of DNA into lymphoma cells by DNA-bound to T101-biotinylated-avidin-polylysine antibody complex'. JOURNAL OF NUCLEAR MEDICINE (1996) VOL. 37, NO 5, SUPPL., PP.62P. MEETING INFO: 43<sup>RD</sup> ANNUAL MEETING OF THE SOCIETY OF NUCLEAR MEDICINE DENVER, COLORADO, USA, JUNE 3-5, 1996.

3. **Lack of novelty; PCT Article 33(2)**

3.1 Document D1 describes a nucleic acid transfer system, including a translocation domain of toxins, for targeting a nucleic acid to a specific cell and obtaining expression of said nucleic acid (abstract). The system described in D1 includes a multidomain protein and a nucleic acid. The multidomain protein of D1 includes a binding domain or a target cell-specific ligand, a translocation domain facilitating the escape of the effector nucleic acid from endocytic vesicles, a nucleic acid binding domain recognising and binding with high affinity to a defined structure of the effector nucleic acid (page 4, last 10 lines and page 5, lines 29-33). The protein may further include an endoplasmic reticulum retention signal and a nuclear localisation signal (page 5, lines 1-3 and lines 29-33). The translocation domain used in the multidomain protein may be derived from bacterial toxins (page 5, line 20 and page 10, lines 9-11). The target cell binding domain may be an antibody (page 7, lines 10-11) and more preferably the single chain antigen binding domain of an antibody (page 8, line 7), directed preferentially against an antigen

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

with enhanced or specific expression at the surface of tumour cells as compared with normal cells (page 8, lines 20-21). The nucleic acid binding domain may be an RNA binding domain or, more preferably, a DNA binding domain (page 10, lines 23-25). One example of a preferred multidomain protein is given on page 11, second paragraph. D1 also provides examples of proteins coded by the nucleic acid molecule to be inserted, when used for treating tumour cells (page 20, lines 7-11). The system described in D1 may be used for preventing, stabilising or reversing diseases such as AIDS, diabetes, Alzheimer's disease or heart problems, as well as for treating cancers (page 20, lines 29-35). In the treatment of cancers, the use of antisense constructs to block oncogen expression is mentioned (page 20, lines 32-33). The use of polycations, protamine or histones is also discussed (page 20, line 35 to page 21, line 4).

The subject matter of Claims 1, 14, 36-38, 40, 49-50 and 53-63 cannot be considered to be novel over the teaching of D1 (PCT Article 33(2)).

- 3.2 Document D2 is a publication corresponding to the patent application D1 and contains information more or less identical with that of D1.

The subject of Claims 1, 14, 36-38, 40, 49-50 and 53-63 cannot therefore be considered to be novel over the teaching of D2 (PCT Article 33(2)).

- 3.3 Document D3 describes a conjugate containing avidin, polylysine covalently bound to the avidin, a biotinylated monoclonal antibody bound to the avidin via biotin and the DNA of the plasmid pGL2 non-

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

covalently bound to the polylysine. Said conjugate has been used for transfecting CCRF-CEM cells.

The subject matter of Claims 14, 36-37, 41-44 and 49-50 cannot therefore be considered to be novel over the teaching of D3 (PCT Article 33(2)).

- 3.4 Document D4 describes a conjugate including an oligonucleotide (ODN) bound to a peptide cleavable by a proteolytic enzyme. Said peptide, in turn, is covalently bound to a carrier or a ligand for specific cell targeting (Abstract). D4 indicates that the ODNs contain 5 to 100 nucleotides and may be antisense oligonucleotides (page 1, lines 3-10). The ODNs of document D4 are therapeutic ODNs (page 6, lines 22-23). The carriers are divided into three categories, the third of which includes antibodies (page 9, line 15). Figure 4 of document D4 shows three classes of conjugates. The conjugates of the third class use ligands that bind specifically with receptors (page 6, lines 29-30). Said conjugates may be obtained by two methods (page 17, lines 11-19), and method B, shown in Figure 4, involves an ODN/peptide cleavable by a proteolytic enzyme/monoclonal antibody conjugate (Figure 4, and page 17, lines 16-19).

The subject matter of Claims 20, 36-37, 40, 49-50 and 53-63 cannot therefore be considered to be novel over the teaching of D4 (PCT Article 33(2)).

- 3.5 The subject matter of Claims 2-13, 15-19, 21-35, 39, 45-48 and 51-52 has never been described in the documents cited in the international search report (ISR). Claims 2-13, 15-19, 21-35, 39, 45-48 and 51-

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



52 are therefore considered to be novel under the terms of PCT Article 33(2).

4. **Lack of inventive step; PCT Article 33(3)**

The most relevant document for assessing the inventiveness of the claims is document D1 (see Box VIII-3.1 for the content).

The conjugates described in D1 include:

- a nucleic acid molecule;
- an antibody domain specific for a cell surface antigen;
- a translocation domain;
- a molecule interacting with nucleic acids,

which have been described as important domains in the present application. Most of the conjugates described in the present application only differ from the compounds described in D1 by virtue of the nature of the bond between the various components of the conjugate. In the conjugates of D1, the various functional domains, with the exception of the nucleic acid molecule, are bound via peptide bonds within a multidomain protein. In the present application, the various domains are bound by bridging agents, a molecule such as avidin or a "chemical" covalent bond.

The use of bridging agents or covalent bonds to bind biological molecules, and in particular polypeptides, is well known to a person skilled in the art and cannot be considered to be inventive. Similarly, the interest of the avidin molecule - which has high affinity for biotin - as a molecule

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

binding various polypeptides was well known to a person skilled in the art, and the use thereof in the field of conjugates for transferring nucleic acid molecules to cells has already been described (see, e.g. document D3). The use of an avidin molecule as a bridging molecule cannot therefore be considered to be inventive.

Another difference between the conjugates described in D1 and those of the present application relates to the presence of a peptide cleavable by at least one glycolytic and/or peptidic enzyme. The use of cleavable peptides is well known to a person skilled in the art and the use thereof in the field of conjugates for transferring nucleic acid molecules to cells has already been described (see, e.g. document D4). The use of cleavable peptides in the compounds of the present application cannot therefore be considered to be inventive.

The subject matter of Claims 1-63 cannot therefore be considered to be inventive (PCT Article 33(3)).

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

**VIII. Certain observations on the international application**

The following observations on the clarity of the claims, description, and drawings or on the question whether the claims are fully supported by the description, are made:

**Lack of clarity; PCT Article 6**

1. Claim 1 of the present application lacks clarity for the following reasons:

(i) The way in which the various components, i.e. the nucleic acid molecule, the translocation domain and the specific antibody, are to be conjugated is not defined. The International Preliminary Examining Authority considers that all the possible combinations will not have the effect described with regard to the compounds of the present application, and that a person skilled in the art, faced with the large selection of conjugation possibilities, will be unable to identify those whereby "said conjugate is efficiently transfected in said cell" without excessive experimental work (PCT Article 5 in combination with PCT Article 6).

(ii) The expression "translocation domain" is vague and leads to a lack of clarity in the claim. Even if said term is defined in the description of the present application, the applicant's attention is drawn to the fact that, according to the PCT Guidelines, Chapter III-4.2, PCT Gazette 29.10.98, a claim must be drafted "(...) in such a way that the meaning thereof is clear from the wording of the claim alone".

This observation also applies to Claims 2, 5, 6, 8, 9, 11-13, 26-27, 31-33 and 47.

(iii) The expression "bridging agent" is vague and

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

## VIII. Certain observations on the international application

leads to a lack of clarity in the claim.

This observation also applies to Claims 3-4, 6, 9, 12-13, 18, 23-24 and 27.

2. Claim 2 refers to a conjugate as per Claim 1, characterised in that it further includes a peptide cleavable, inter alia, by a glycolytic enzyme. It is not clear to the International Preliminary Examining Authority what type of peptide can be cleaved by a glycolytic enzyme.

This observation also applies to Claims 13, 15 and 20.

3. In Claim 3 of the present application, the expression "preferably" is used. The applicant's attention is drawn to the fact that, according to the PCT Guidelines, Chapter III-4.6, PCT Gazette, 29.10.98, "expressions such as "in particular", "preferably", "for example", "such as" or "more particularly" "have no limiting effect on the scope of a claim; in other words, the feature following such an expression is to be considered entirely optional".

This observation also applies to Claims 4, 16, 17 and 22.

4. Claim 4 of the present application refers to a "molecule such as avidin". The use of this vague expression leads to a lack of clarity in the claim. The applicant's attention is drawn to the fact that, even if said expression is defined in the description of the present application, according to the PCT Guidelines, Chapter III-4.2, PCT Gazette,

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



## VIII. Certain observations on the international application

29.10.98, a claim must be drafted "(...) in such a way that the meaning thereof is clear from the wording of the claim alone".

This observation also applies to Claims 12-13, 17, 22, 30-31 and 34.

5. Claim 9 refers to a "nucleic acid binding molecule". This vague expression leads to a lack of clarity in the claim. The applicant's attention is drawn to the fact that, even if said expression is defined in the description of the present application, according to the PCT Guidelines, Chapter III-4.2, PCT Gazette, 29.10.98, a claim must be drafted "(...) in such a way that the meaning thereof is clear from the wording of the claim alone".

This observation also applies to Claims 11-15, 18, 24, 27, 32, 34 and 41.

This observation likewise applies to Claim 42, but with regard to a "nucleic acid binding protein".

6. Claim 14 refers to a conjugate for transferring a nucleic acid molecule, characterised in that it includes: a nucleic acid molecule, an antibody specific for a cell surface antigen and a nucleic acid binding molecule. The applicant's attention is drawn to the fact that the wording of Claim 14 does not imply any bond between the various compounds. In its broadest meaning, said claim could include a mixture of the three above-mentioned components. When correcting Claim 14, the applicant should bear in mind the observations made in paragraph 1 of Box VIII.

This observation also applies to Claim 20.

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

## VIII. Certain observations on the international application

7. In Claim 37, the double- or single-stranded DNA are described in terms of the fact that they code for "a protein material of interest that is efficiently expressed in the cell". This vague expression leads to a lack of clarity in the claim. Moreover, the protein material of interest is characterised in that it "is efficiently expressed in the cell", i.e. in terms of the result to be achieved for said material. According to the PCT Guidelines, Chapter III-4.7, PCT Gazette, 29.10.98, "the area defined by the claims must be as precise as the invention allows. As a general rule, claims which attempt to define the invention, or a feature thereof, by a result to be achieved should be objected to".
8. In Claim 38, the protein material must be selected from a group consisting, inter alia, of "killer genes" and "genes for countering chemoresistance". Said claim lacks clarity for the following reasons:
- (i) a protein material cannot be a gene.
  - (ii) there is no definition of "killer genes" or "genes for countering chemoresistance", thereby leading to a lack of clarity. The applicant's attention is drawn to the fact that, even if said expressions are defined in the description of the present application, according to the PCT Guidelines, Chapter III-4.2, PCT Gazette, 29.10.98, a claim must be drafted "(...) in such a way that the meaning thereof is clear from the wording of the claim alone".

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

## VIII. Certain observations on the international application

(iii) Claim 38 refers to a conjugate according to Claim 35, characterised in that "said material of interest (...)". The applicant's attention is drawn to the fact that Claim 35 does not refer to a material of interest. The appropriateness of this reference of Claim 38 to Claim 35 should be checked.

9. Claim 43 refers to polycationic polymers. The definition of a "free polycation" is not clear to the International Preliminary Examining Authority.
10. In Claim 48, the translocation domain is characterised in that it is a fragment of Haemophilus A hemagglutinin. No delimitation and/or sequence is provided for said fragment, thereby leading to a lack of clarity.
11. Claim 58 refers to a conjugate used as a drug for transferring a nucleic acid molecule to a cell, characterised in that said cell is contacted with said conjugate so as to transfect said cell with said conjugate. The applicant's attention is drawn to the fact that the characterising portion of said claim is a method step, which casts doubt as to the category of Claim 58.

According to the PCT Guidelines, Chapter III-4.1, PCT Gazette, 29.10.98, "in view of the differences in the scope of protection which may be attached to the various categories of claims, the examiner should draw attention to any wording of a claim leaving doubt as to its category".

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

**INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT**

International application No.

PCT/FR 00/01259

**VIII. Certain observations on the international application**

This observation also applies to Claims 59-62.

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



09 1926493

15 + T



# TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS

## PCT

REC'D 27 AUG 2001

### RAPPORT D'EXAMEN PRELIMINAIRE INTERNATIONAL

(article 36 et règle 70 du PCT)

Référence du dossier du déposant ou du mandataire 340833/18162	<b>POUR SUITE A DONNER</b> voir la notification de transmission du rapport d'examen préliminaire international (formulaire PCT/IPEA/416)	
Demande internationale n° PCT/FR00/01259	Date du dépôt international (jour/mois/année) 10/05/2000	Date de priorité (jour/mois/année) 10/05/1999
Classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois classification nationale et CIB C12N15/87		
Déposant CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SC.... et al.		
<p>1. Le présent rapport d'examen préliminaire international, établi par l'administration chargée de l'examen préliminaire international, est transmis au déposant conformément à l'article 36.</p> <p>2. Ce RAPPORT comprend 14 feuilles, y compris la présente feuille de couverture.</p> <p><input type="checkbox"/> Il est accompagné d'ANNEXES, c'est-à-dire de feuilles de la description, des revendications ou des dessins qui ont été modifiées et qui servent de base au présent rapport ou de feuilles contenant des rectifications faites auprès de l'administration chargée de l'examen préliminaire international (voir la règle 70.16 et l'instruction 607 des Instructions administratives du PCT).</p> <p>Ces annexes comprennent feuilles.</p> <p>3. Le présent rapport contient des indications relatives aux points suivants:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>I <input checked="" type="checkbox"/> Base du rapport</li> <li>II <input checked="" type="checkbox"/> Priorité</li> <li>III <input type="checkbox"/> Absence de formulation d'opinion quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle</li> <li>IV <input checked="" type="checkbox"/> Absence d'unité de l'invention</li> <li>V <input checked="" type="checkbox"/> Déclaration motivée selon l'article 35(2) quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui de cette déclaration</li> <li>VI <input type="checkbox"/> Certains documents cités</li> <li>VII <input type="checkbox"/> Irrégularités dans la demande internationale</li> <li>VIII <input checked="" type="checkbox"/> Observations relatives à la demande internationale</li> </ul>		
Date de présentation de la demande d'examen préliminaire internationale 04/12/2000	Date d'achèvement du présent rapport 23.08.2001	
Nom et adresse postale de l'administration chargée de l'examen préliminaire international:  Office européen des brevets D-80298 Munich Tél. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4465	Fonctionnaire autorisé Mundel, C N° de téléphone +49 89 2399 7314 	

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

# RAPPORT D'EXAMEN PRÉLIMINAIRE INTERNATIONAL

Demande internationale n° PCT/FR00/01259

## I. Base du rapport

1. En ce qui concerne les **éléments** de la demande internationale (*les feuilles de remplacement qui ont été remises à l'office récepteur en réponse à une invitation faite conformément à l'article 14 sont considérées dans le présent rapport comme "initialement déposées" et ne sont pas jointes en annexe au rapport puisqu'elles ne contiennent pas de modifications (règles 70.16 et 70.17)*):

### Description, pages:

1-29                      version initiale

### Revendications, N°:

1-63                      version initiale

### Dessins, feuilles:

1/7-7/7                      version initiale

2. En ce qui concerne la **langue**, tous les éléments indiqués ci-dessus étaient à la disposition de l'administration ou lui ont été remis dans la langue dans laquelle la demande internationale a été déposée, sauf indication contraire donnée sous ce point.

Ces éléments étaient à la disposition de l'administration ou lui ont été remis dans la langue suivante: , qui est :

- ☐ la langue d'une traduction remise aux fins de la recherche internationale (selon la règle 23.1(b)).
- ☐ la langue de publication de la demande internationale (selon la règle 48.3(b)).
- ☐ la langue de la traduction remise aux fins de l'examen préliminaire internationale (selon la règle 55.2 ou 55.3).

3. En ce qui concerne les **séquences de nucléotides ou d'acide aminés** divulguées dans la demande internationale (le cas échéant), l'examen préliminaire internationale a été effectué sur la base du listage des séquences :

- ☐ contenu dans la demande internationale, sous forme écrite.
- ☐ déposé avec la demande internationale, sous forme déchiffrable par ordinateur.
- ☐ remis ultérieurement à l'administration, sous forme écrite.
- ☐ remis ultérieurement à l'administration, sous forme déchiffrable par ordinateur.
- ☐ La déclaration, selon laquelle le listage des séquences par écrit et fourni ultérieurement ne va pas au-delà de la divulgation faite dans la demande telle que déposée, a été fournie.
- ☐ La déclaration, selon laquelle les informations enregistrées sous déchiffrable par ordinateur sont identiques à celles du listage des séquences Présenté par écrit, a été fournie.

4. Les modifications ont entraîné l'annulation :

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

**RAPPORT D'EXAMEN  
PRÉLIMINAIRE INTERNATIONAL**

Demande internationale n° PCT/FR00/01259

- ☐ de la description, pages :
- ☐ des revendications, n°s :
- ☐ des dessins, feuilles :

5. ☐ Le présent rapport a été formulé abstraction faite (de certaines) des modifications, qui ont été considérées comme allant au-delà de l'exposé de l'invention tel qu'il a été déposé, comme il est indiqué ci-après (règle 70.2(c)) :

*(Toute feuille de remplacement comportant des modifications de cette nature doit être indiquée au point 1 et annexée au présent rapport)*

6. Observations complémentaires, le cas échéant :

**II. Priorité**

1. ☐ Le présent rapport a été formulée comme si aucune priorité n'avait été revendiquée, du fait que les documents suivants n'ont pas été remis dans le délai prescrit :
- ☐ copie de la demande antérieure dont la priorité a été revendiquée.
  - ☐ traduction de la demande antérieure dont la priorité a été revendiquée.
2. ☐ Le présent rapport a été formulée comme si aucune priorité n'avait été revendiquée, du fait que la revendication de la priorité a été jugée non valable.

Pour les besoins du présent rapport, la date de dépôt international indiquée plus haut est donc considérée comme la date pertinente.

3. Observations complémentaires, le cas échéant :  
**voir feuille séparée**

**IV. Absence d'unité de l'invention**

1. En réponse à l'invitation à limiter les revendications ou à payer des taxes additionnelles, le déposant a
- ☐ limité les revendications.
  - ☐ payé des taxes additionnelles.
  - ☐ payé des taxes additionnelles sous réserve.
  - ☐ ni limité les revendications ni payé des taxes additionnelles.
2. ☒ L'administration chargée de l'examen préliminaire international estime qu'il n'est pas satisfait à l'exigence d'unité d'invention et décide, conformément à la règle 68.1, de ne pas inviter le déposant à limiter les revendications ou à payer des taxes additionnelles.

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

**RAPPORT D'EXAMEN  
PRÉLIMINAIRE INTERNATIONAL**

Demande internationale n° PCT/FR00/01259

3. L'administration chargée de l'examen préliminaire international estime que, aux termes des règles 13.1, 13.2 et 13.3,

- ☐ il est satisfait à l'exigence d'unité de l'invention.
- ☒ il n'est pas satisfait à l'exigence d'unité de l'invention, et ce pour les raisons suivantes :  
**voir feuille séparée**

4. En conséquence, les parties suivantes de la demande internationale ont fait l'objet d'un examen préliminaire international lors de la formulation du présent rapport :

- ☒ toutes les parties de la demande.
- ☐ les parties relatives aux revendications n°s .

**V. Déclaration motivée selon l'article 35(2) quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui de cette déclaration**

**1. Déclaration**

Nouveauté	Oui : Revendications 2-13, 15-19, 21-35, 39, 45-48 et 51-52
	Non : Revendications 1, 14, 20, 36-38, 40-44, 49-50 et 53-63
Activité inventive	Oui : Revendications
	Non : Revendications 1-63
Possibilité d'application industrielle	Oui : Revendications 1-63
	Non : Revendications

**2. Citations et explications**  
**voir feuille séparée**

**VIII. Observations relatives à la demande internationale**

Les observations suivantes sont faites au sujet de la clarté des revendications, de la description et des dessins et de la question de savoir si les revendications se fondent entièrement sur la description :  
**voir feuille séparée**

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



**Concernant le point II**

**Priorité**

L'attention du demandeur est attirée sur le fait que le document de priorité de la présente demande ne fait pas référence à l'utilisation d'un "peptide clivable par au moins une enzyme glycolytique et/ou protéolytique". Toutes les revendications faisant référence à un conjugué comprenant un tel peptide ne bénéficient donc pas de la priorité du 10.05.99.

**Concernant le point IV**

**Absence d'unité de l'invention**

Selon la règle 13 PCT, une demande internationale ne peut porter que sur une invention ou sur une pluralité d'inventions liées entre elles de telle sorte qu'elles ne forment qu'un seul concept inventif général, c.à.d. une pluralité d'invention ayant au moins une caractéristique technique commune déterminant une contribution par rapport à l'état de la technique.

L'Autorité Chargée de l'Examen Préliminaire International (ACEPI) a identifié les groupes suivants dans la présente demande :

- A. Les revendications 1 et 29 (complètement) et 2-13, 26-33, 36-63 (partiellement) font référence à des conjugués pour le transfert d'une molécule d'acide nucléique caractérisés en ce qu'ils comprennent une molécule d'acide nucléique, un domaine de translocation et un anticorps spécifique d'un antigène de surface de ladite cellule, et optionnellement un peptide clivable par au moins une enzyme glycolytique et/ou protéolytique et/ou une molécule de type avidine et/ou une molécule de liaison aux acides nucléiques.
- B. Les revendications 14 (complètement) et 9-13, 15-19, 24-28, 30-63 (partiellement) font référence à des conjugués pour le transfert d'une molécule d'acide nucléique dans une cellule caractérisés en ce qu'ils comprennent une molécule d'acide nucléique, un anticorps spécifique d'un antigène de surface de cellule et une molécule de liaison aux acides nucléiques, et optionnellement un peptide clivable par au moins une enzyme glycolytique et/ou protéolytique et/ou

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

une molécule de type avidine.

- C. Les revendications 20-23 (complètement) et 2-3, 5-11, 13, 15-28, 31, 33-63 (partiellement) font référence à des conjugués pour le transfert d'une molécule d'acide nucléique dans une cellule caractérisés en ce qu'ils comprennent une molécule d'acide nucléique, un anticorps spécifique d'un antigène de surface de cellule et un peptide clivable par au moins une enzyme glycolytique et/ou protéolytique et optionnellement une molécule de type avidine et/ou une molécule de liaison aux acides nucléiques et/ou un domaine de translocation.

Le seul concept commun reliant les différents groupes mentionnés ci-dessus est un conjugué pour le transfert d'une molécule d'acide nucléique dans une cellule caractérisé en ce qu'il comprend une molécule d'acide nucléique, un anticorps spécifique d'un antigène de surface d'une cellule et au moins une autre molécule. Ce concept commun n'étant ni nouveau (voir point V-3), ni inventif (voir point V-4), les différents groupes mentionnés ci-dessus représentent des inventions indépendantes.

#### **Concernant le point V**

**Déclaration motivée selon la règle 66.2(a)(ii) quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui de cette déclaration**

1. La présente demande fait référence à des conjugués pour le transfert d'une molécule d'acide nucléique dans une cellule caractérisés en ce qu'ils comprennent une molécule d'acide nucléique, un anticorps spécifique d'un antigène de surface de ladite cellule et au moins une autre molécule choisie parmi : un domaine de translocation, une molécule de liaison aux acides nucléiques ou un peptide clivable par une enzyme glycolytique et/ou protéolytique. La demande fait également référence à l'utilisation desdits conjugués pour la fabrication de médicaments.
2. **Il est fait référence aux documents suivants :**

D1: WO 96 13599 A (WELS WINFRIED ;FOMINAYA JESUS (CH)) 9 mai 1996  
(1996-05-09) cité dans la demande

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

- D2: FOMINAYA J ET AL: 'Target cell-specific DNA transfer mediated by a chimeric multidomain protein. Novel non-viral gene delivery system.' JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, (1996 MAY 3) 271 (18) 10560-8., cité dans la demande
- D3: WO 94 13325 A (MICROPROBE CORP) 23 juin 1994 (1994-06-23)
- D4: CHAKRABARTI, M. ET AL: 'Transfer of DNA into lymphoma cells by DNA-bound to T101- biotinylated -avidin- polylysine antibody complex.' JOURNAL OF NUCLEAR MEDICINE, (1996) VOL. 37, NO. 5 SUPPL., PP. 62P. MEETING INFO.: 43RD ANNUAL MEETING OF THE SOCIETY OF NUCLEAR MEDICINE DENVER, COLORADO, USA JUNE 3-5, 1996.

### 3. Défaut de nouveauté; article 33(2) PCT.

- 3.1 Le document D1 décrit un système de transfert des acides nucléiques, comprenant un domaine de translocation de toxine, pour le ciblage d'un acide nucléique dans une cellule spécifique et pour obtenir l'expression dudit acide nucléique. (Abstract). Le système décrit dans D1 comprend une protéine multidomaines et un acide nucléique. La protéine multidomaine de D1 comprend un domaine de liaison ou ligand spécifique de la cellule cible, un domaine de translocation permettant à l'acide nucléique effecteur d'échapper aux vésicules endocytiques, un domaine de liaison aux acides nucléiques reconnaissant et se liant avec une grande affinité à une structure définie de l'acide nucléique effecteur (p. 4, 10 dernières lignes et p. 5, lignes 29-33). La protéine peut en outre comprendre un signal de rétention dans le réticulum endoplasmique et un signal de localisation nucléaire (p. 5, lignes 1-3 et lignes 29-33). Le domaine de translocation utilisé dans la protéine multidomaines peut être dérivé de toxines bactériennes (p. 5, ligne 20 et p. 10, lignes 9-11). Le domaine de liaison de la cellule cible peut être un anticorps (p. 7, lignes 10-11) et plus préférentiellement le domaine de liaison à l'antigène simple chaîne d'un anticorps (p. 8, ligne 7) dirigé préférentiellement contre un antigène dont l'expression est augmentée ou spécifique à la surface de cellules tumorales par rapport à des cellules normales (p. 8, lignes 20-21). Le domaine de liaison aux acides nucléiques peut être un domaine de liaison à l'ARN ou plus préférentiellement à l'ADN (p. 10, lignes 23-25). Un exemple de protéine multidomaine préférée est

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

donné p. 11, deuxième paragraphe. D1 donne également des exemples de protéines codées par la molécule d'acide nucléique à introduire dans le cas d'une utilisation dans le traitement de cellules tumorales (p. 20, lignes 7-11). Le système décrit dans D1 peut être utilisé pour la prévention, la stabilisation ou la réversion de maladies comme le SIDA, le diabète, la maladie d'Alzheimer ou les problèmes cardiaques ainsi que le traitement des cancers (p. 20, lignes 29-35). Dans le cas du traitement des cancers, l'utilisation de constructions antisens pour bloquer l'expression de l'oncogène est mentionnée (p. 20, lignes 32-33). L'usage de polycations, de protamine ou d'histones est également discuté (p. 20, ligne 35 à p. 21, ligne 4).

L'objet des revendications 1, 14, 36-38, 40, 49-50 et 53-63 ne peut pas être considéré comme nouveau vis à vis de l'enseignement de D1 (article 33(2) PCT).

- 3.2 Le document D2 est une publication correspondant à la demande de brevet D1 et contient à peu près les mêmes informations que D1.

L'objet des revendications 1, 14, 36-38, 40, 49-50 et 53-63 ne peut donc pas être considéré comme nouveau vis à vis de l'enseignement de D2 (article 33(2) PCT).

- 3.3 Le document D3 décrit un conjugué comprenant de l'avidine, de la polylysine liée à l'avidine par une liaison covalente, un anticorps monoclonal biotinylé lié à l'avidine par la biotine et l'ADN du plasmide pGL2 lié par une liaison non covalente à la polylysine. Ce conjugué a été utilisé pour la transfection de cellules CCRF-CEM.

L'objet des revendications 14, 36-37, 41-44 et 49-50 ne peut donc pas être considéré comme nouveau par rapport à l'enseignement de D3 (article 33(2) PCT).

- 3.4 Le document D4 décrit un conjugué comprenant un oligonucléotide (ODN) lié à un peptide clivable par une enzyme protéolytique. Ce peptide est à son tour lié de façon covalente à un "carrier" ou à un ligand pour le ciblage dans

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



une cellule spécifique (Abstract). D4 signale que les ODN comprennent entre 5 et 100 nucléotides et peuvent être des oligonucléotides antisens (p. 1, lignes 3-10). Les ODNs selon le document D4 sont des ODNs thérapeutiques (p. 6, lignes 22-33). Les "carriers" sont divisés en trois catégories dont la troisième comprend des anticorps (p. 9, ligne 15). La figure 4 du document D4 illustre 3 classes de conjugués. Les conjugués de la troisième classe utilisent des ligands se liant spécifiquement à des récepteurs (p. 16, lignes 29-30). Ces conjugués peuvent être obtenus par deux méthodes (p. 17, lignes 11-19) et la méthode B illustrée dans la figure 4 montre un conjugué ODN-peptide clivable par une enzyme protéolytique-anticorps monoclonal (Fig 4 et p. 17, lignes 16-19).

L'objet des revendications 20, 36-37, 40, 49-50 et 53-63 ne peut donc pas être considéré comme nouveau vis à vis de l'enseignement de D4 (article 33(2) PCT).

- 3.5 L'objet des revendications 2-13, 15-19, 21-35, 39, 45-48 et 51-52 n'a jamais été décrit dans les documents cités dans le Rapport de Recherche International (RRI). Les revendications 2-13, 15-19, 21-35, 39, 45-48 et 51-52 sont donc considérées comme nouvelles dans le sens de l'article 33(2) PCT.

#### **4. Défaut d'inventivité; article 33(3) PCT.**

Le document le plus pertinent pour l'évaluation de l'inventivité des revendications est le document D1 (voir point VIII-3.1 pour le contenu).

Les conjugués décrits dans D1 comprennent :

- une molécule d'acide nucléique.
- un domaine anticorps spécifique d'un antigène de surface d'une cellule.
- un domaine de translocation.
- une molécule d'interaction avec les acides nucléiques.

qui ont été décrits comme des domaines importants dans la présente demande.

La plupart des conjugués de la présente demande ne diffèrent des composés décrits dans D1 que par la nature de la liaison entre les différents composants du

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

conjugué. Dans les conjugués du document D1, les différents domaines fonctionnels, à l'exception de la molécule d'acide nucléique, sont liés par des liaisons peptidiques au sein d'une protéine multidomaine. Dans la présente demande, les différents domaines sont liés par des agents de pontage, une molécule de type avidine ou une liaison covalente "chimique".

L'utilisation d'agents de pontages ou de liaisons covalentes pour lier des molécules biologiques et plus particulièrement des polypeptides est bien connue de l'homme du métier et ne peut donc pas être considérée comme inventive. De même, l'intérêt de la molécule d'avidine - qui a une forte affinité pour la biotine - comme molécule de liaison entre différents polypeptides était bien connu de l'homme du métier et son application dans le domaine des conjugués pour le transfert de molécules d'acide nucléique dans les cellules a déjà été décrite (voir par exemple le document D3). L'utilisation de molécule d'avidine comme molécules de pontage ne peut donc pas être considérée comme inventive.

Une autre différence entre les conjugués décrits dans D1 et les conjugués de la présente demande est la présence d'un peptide clivable par au moins une enzyme glycolytique et/ou peptidique. L'utilisation de peptides clivables est bien connue de l'homme du métier et son application dans le domaine des conjugués pour le transfert de molécules d'acide nucléique dans les cellules a déjà été décrite (voir par exemple le document D4). L'utilisation de peptides clivables dans les composés de la présente demande ne peut donc pas être considérée comme inventive.

L'objet des revendications 1-63 ne peut donc pas être considéré comme inventif (article 33(3) PCT).

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

**Concernant le point VIII**

**Observations relatives à la demande internationale**

**Défaut de clarté; article 6 PCT.**

1. La revendication 1 de la présente demande manque de clarté pour les raisons suivantes :
  - (i) Aucune indication n'est donnée quand à la façon dont les différents composants : molécule d'acide nucléique, domaine de translocation et anticorps spécifique doivent être conjugués. L'ACEPI considère que toutes les combinaisons possibles ne vont pas avoir l'effet décrit pour les composés de la présente demande et que l'homme du métier, face au grand choix de possibilités de conjugaison, ne va pas être capables d'identifier celles telles que " ledit conjugué est transfecté efficacement dans ladite cellule" sans travail excessif d'expérimentation (article 5 PCT en combinaison avec l'article 6 PCT).
  - (ii) L'expression "domaine de translocation" est vague ce qui nuit à la clarté de la revendication. Même si ce terme est défini dans la description de la présente demande, l'attention du demandeur est attirée sur le fait que, selon la Gazette du PCT du 29.10.98 "Directives concernant l'examen préliminaire international selon le PCT", chapitre III-4.2, une revendication doit être rédigée "(...) de façon que sa signification ressorte clairement de son texte même".

Cette remarque est également valable pour les revendications 2, 5, 6, 8, 9, 11-13, 26-27, 31-33 et 47.
  - (iii) L'expression "agent de pontage" est vague ce qui nuit à la clarté de la revendication.

Cette remarque est également valable pour les revendications 3-4, 6, 9, 12-13, 18, 23-24 et 27.
2. La revendication 2 fait référence à un conjugué selon la revendication 1 caractérisé en ce qu'il comprend en outre un peptide clivable, entre autres, par une enzyme glycolytique. Il n'est pas clair pour l'ACEPI quel type de peptide peut être coupé par une enzyme glycolytique.

Cette remarque est également valable pour les revendications 13, 15 et 20.

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

3. Dans la revendication 3 de la présente demande, l'expression "de préférence" est utilisée. L'attention du demandeur est attirée sur le fait que, selon la Gazette du PCT du 29.10.98 "Directives concernant l'examen préliminaire international selon le PCT", chapitre III-4.6 : les expressions comme "notamment", "de préférence", "par exemple", "tel que" ou "plus particulièrement" "n'ont aucun effet limitatif sur la portée d'une revendication; en d'autres termes, la caractéristique qui suit une telle expression doit être considérée comme entièrement facultative".  
Cette remarque est également valable pour les revendications 4, 16, 17 et 22.
4. La revendication 4 de la présente demande fait référence à une "molécule de type avidine". L'utilisation de cette expression vague nuit à la clarté de la revendication. L'attention du demandeur est attirée sur le fait que même si cette expression est définie dans la description de la présente demande, selon la Gazette du PCT du 29.10.98 "Directives concernant l'examen préliminaire international selon le PCT", chapitre III-4.2, une revendication doit être rédigée "(...) de façon que sa signification ressorte clairement de son texte même".  
Cette remarque st également valable pour les revendications 12-13, 17, 22, 30-31 et 34.
5. La revendication 9 fait référence à une "molécule de liaison aux acides nucléiques". Cette expression est vague et nuit à la clarté de la revendication. L'attention du demandeur est attirée sur le fait que même si cette expression est définie dans la description de la présente demande, selon la Gazette du PCT du 29.10.98 "Directives concernant l'examen préliminaire international selon le PCT", chapitre III-4.2, une revendication doit être rédigée "(...) de façon que sa signification ressorte clairement de son texte même".  
Cette remarque est également valable pour les revendications 11-15, 18, 24, 27, 32, 34 et 41.  
Cette remarque s'applique également à la revendication 42 mais concernant une "protéine de liaison aux acides nucléiques".
6. La revendication 14 fait référence à un conjugué pour le transfert d'une molécule d'acide nucléique caractérisé en ce qu'il comprend : une molécule d'acide nucléique, un anticorps spécifique d'un antigène de surface de cellule et une molécule de liaison aux acides nucléiques. L'attention du demandeur est attirée

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



sur le fait que la formulation de la revendication 14 n'implique aucune liaison entre les différents composés. Dans son sens le plus large, cette revendication pourrait comprendre un mélange des trois composants mentionnés. Pour la correction de la revendication 14, l'attention du demandeur est également attirée sur les remarques du point VIII-1.

Cette remarque est également valable pour la revendication 20.

7. Dans la revendication 37, l'ADN double brin ou l'ARN simple brin sont décrits par le fait qu'ils codent pour "un produit protéique d'intérêt qui s'exprime efficacement dans la cellule". Cette expression est vague et nuit à la clarté de la revendication. De plus, le produit protéique d'intérêt est caractérisé par le fait qu'il "s'exprime efficacement dans la cellule" c.à.d. par le résultat recherché pour ledit produit protéique d'intérêt. Selon la Gazette du PCT du 29.10.98 "Directives concernant l'examen préliminaire international selon le PCT", chapitre III-4.7 : "Le champ défini par les revendications doit être aussi précis que l'invention le permet. En règle générale, les revendications qui tentent de définir l'invention ou l'une de ses caractéristiques par le résultat recherché ne doivent pas être admises".
8. Dans la revendication 38, le produit protéique doit être choisi dans un groupe composé, entre autres, des "gènes tueurs" et des "gènes qui permettent de lever la chimiorésistance". Cette revendication manque de clarté pour les raisons suivantes :
  - (i) Un produit protéique ne peut pas être un gène.
  - (ii) Il n'y a aucune définition de ce que des "gènes tueurs" ou des "gènes qui permettent de lever la chimiorésistance" peuvent être ce qui nuit à la clarté de la revendication. L'attention du demandeur est attirée sur le fait que même si ces expressions sont définies dans la description de la présente demande, selon la Gazette du PCT du 29.10.98 "Directives concernant l'examen préliminaire international selon le PCT", chapitre III-4.2, une revendication doit être rédigée "(...) de façon que sa signification ressorte clairement de son texte même".

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

- (iii) La revendication 38 fait référence à un conjugué selon la revendication 35 caractérisé en ce que ledit produit d'intérêt (...). L'attention du demandeur est attirée sur le fait que la revendication 35 ne fait pas référence à un produit d'intérêt. La dépendance de la revendication 38 devrait donc être vérifiée.
9. La revendication 43 fait référence à des polymères polycationiques. La définition de ce qu'est un "polycation libre" n'est pas claire pour l'ACEPI.
10. Dans la revendication 48, le domaine de translocation est caractérisé par le fait qu'il s'agit d'un fragment de l'hémagglutinine d'*Haemophilus A*. Dans cette revendication, aucune délimitation et/ou séquence n'est donnée pour ledit fragment ce qui nuit à la clarté de la revendication.
11. La revendication 58 fait référence à un conjugué à titre de médicament destiné au transfert d'une molécule d'acide nucléique dans une cellule caractérisé en ce que ladite cellule est mise en contact avec ledit conjugué de façon à transférer ladite cellule avec ledit conjugué. L'attention du demandeur est attirée sur le fait que la partie caractérisante de cette revendication est une étape de méthode ce qui introduit un doute quant à la catégorie de la revendication 58.
- Selon la Gazette du PCT du 29.10.98 "Directives concernant l'examen préliminaire international selon le PCT", chapitre III-4.1 : "Etant donné les différences de portée de protection qui peuvent découler des diverses catégories de revendications, l'examineur devra attirer l'attention sur tout libellé d'une revendication qui laisse subsister un doute quant à sa catégorie".
- Cette remarque est également valable pour les revendications 59-62.

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

# PCT

## REQUÊTE

Le soussigné requiert que la présente demande internationale soit traitée conformément au Traité de coopération en matière de brevets.

Réservé à l'office récepteur

Demande internationale n°

Date du dépôt international

Nom de l'office récepteur et "Demande internationale PCT"

Référence du dossier du déposant ou du mandataire (facultatif)  
(12 caractères au maximum) 340833/18162

**Cadre n° I TITRE DE L'INVENTION** CONJUGUE ACIDE NUCLEIQUE-ANTICORPS POUR DELIVRER UN ACIDE NUCLEIQUE ETRANGER DANS LES CELLULES

**Cadre n° II DÉPOSANT**

Nom et adresse : (Nom de famille suivi du prénom; pour une personne morale, désignation officielle complète. L'adresse doit comprendre le code postal et le nom du pays. Le pays de l'adresse indiquée dans ce cadre est l'État où le déposant a son domicile si aucun domicile n'est indiqué ci-dessous.)

CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE (CNRS)  
3 Rue Michel-Ange  
75794 PARIS CEDEX 16  
FRANCE

☐ Cette personne est aussi inventeur.

n° de téléphone

n° de télécopieur

n° de téléimprimeur

Nationalité (nom de l'État) :  
FR

Domicile (nom de l'État) :  
FR

Cette personne est déposant pour : ☐ tous les États désignés ☒ tous les États désignés sauf les États-Unis d'Amérique ☐ les États-Unis d'Amérique seulement ☐ les États indiqués dans le cadre supplémentaire

**Cadre n° III AUTRE(S) DÉPOSANT(S) OU (AUTRE(S)) INVENTEUR(S)**

Nom et adresse : (Nom de famille suivi du prénom; pour une personne morale, désignation officielle complète. L'adresse doit comprendre le code postal et le nom du pays. Le pays de l'adresse indiquée dans ce cadre est l'État où le déposant a son domicile si aucun domicile n'est indiqué ci-dessous.)

HIRSCH François  
20 Rue Victor Carmignac  
94110 ARCEUIL  
FRANCE

Cette personne est :

☐ déposant seulement

☒ déposant et inventeur

☐ inventeur seulement  
(Si cette case est cochée, ne pas remplir la suite.)

Nationalité (nom de l'État) :  
FR

Domicile (nom de l'État) :  
FR

Cette personne est déposant pour : ☐ tous les États désignés ☐ tous les États désignés sauf les États-Unis d'Amérique ☒ les États-Unis d'Amérique seulement ☐ les États indiqués dans le cadre supplémentaire

☒ D'autres déposants ou inventeurs sont indiqués sur une feuille annexe.

**Cadre n° IV MANDATAIRE OU REPRÉSENTANT COMMUN; OU ADRESSE POUR LA CORRESPONDANCE**

La personne dont l'identité est donnée ci-dessous est/a été désignée pour agir au nom du ou des déposants auprès des autorités internationales compétentes, comme:

☒ mandataire ☐ représentant commun

Nom et adresse : (Nom de famille suivi du prénom; pour une personne morale, désignation officielle complète. L'adresse doit comprendre le code postal et le nom du pays.)

MARTIN Jean-Jacques, SCHRIMPF Robert, AHHER Francis,  
WARCOIN Jacques, TEXIER Christian, LE FORESTIER Eric  
CABINET REGIMBEAU  
26 Avenue Kléber  
75116 PARIS  
FRANCE

n° de téléphone  
01 45 00 92 02

n° de télécopieur  
01 45 00 46 12

n° de téléimprimeur

☐ Adresse pour la correspondance : cocher cette case lorsque aucun mandataire ni représentant commun n'est/n'a été désigné et que l'espace ci-dessus est utilisé pour indiquer une adresse spéciale à laquelle la correspondance doit être envoyée.

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

Suite du cadre n° III AUTRE(S) DÉPOSANT(S) OU (AUTRE(S)) INVENTEUR(S)	
<i>Si aucun des sous-cadres suivants n'est utilisé, cette feuille ne doit pas être incluse dans la requête.</i>	
<p>Nom et adresse : <i>(Nom de famille suivi du prénom; pour une personne morale, désignation officielle complète. L'adresse doit comprendre le code postal et le nom du pays. Le pays de l'adresse indiquée dans ce cadre est l'État où le déposant a son domicile si aucun domicile n'est indiqué ci-dessous.)</i></p> <p>DURRBACH Antoine 1 Rue des Champs 94170 LE PERREUX FRANCE</p>	<p>Cette personne est :</p> <p><input type="checkbox"/> déposant seulement</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> déposant et inventeur</p> <p><input type="checkbox"/> inventeur seulement <i>(Si cette case est cochée, ne pas remplir la suite.)</i></p>
Nationalité (nom de l'État) : FR	Domicile (nom de l'État) : FR
<p>Cette personne est déposant pour : <input type="checkbox"/> tous les États désignés <input type="checkbox"/> tous les États désignés sauf les États-Unis d'Amérique <input checked="" type="checkbox"/> les États-Unis d'Amérique seulement <input type="checkbox"/> les États indiqués dans le cadre supplémentaire</p>	
<p>Nom et adresse : <i>(Nom de famille suivi du prénom; pour une personne morale, désignation officielle complète. L'adresse doit comprendre le code postal et le nom du pays. Le pays de l'adresse indiquée dans ce cadre est l'État où le déposant a son domicile si aucun domicile n'est indiqué ci-dessous.)</i></p>	<p>Cette personne est :</p> <p><input type="checkbox"/> déposant seulement</p> <p><input type="checkbox"/> déposant et inventeur</p> <p><input type="checkbox"/> inventeur seulement <i>(Si cette case est cochée, ne pas remplir la suite.)</i></p>
Nationalité (nom de l'État) :	Domicile (nom de l'État) :
<p>Cette personne est déposant pour : <input type="checkbox"/> tous les États désignés <input type="checkbox"/> tous les États désignés sauf les États-Unis d'Amérique <input type="checkbox"/> les États-Unis d'Amérique seulement <input type="checkbox"/> les États indiqués dans le cadre supplémentaire</p>	
<p>Nom et adresse : <i>(Nom de famille suivi du prénom; pour une personne morale, désignation officielle complète. L'adresse doit comprendre le code postal et le nom du pays. Le pays de l'adresse indiquée dans ce cadre est l'État où le déposant a son domicile si aucun domicile n'est indiqué ci-dessous.)</i></p>	<p>Cette personne est :</p> <p><input type="checkbox"/> déposant seulement</p> <p><input type="checkbox"/> déposant et inventeur</p> <p><input type="checkbox"/> inventeur seulement <i>(Si cette case est cochée, ne pas remplir la suite.)</i></p>
Nationalité (nom de l'État) :	Domicile (nom de l'État) :
<p>Cette personne est déposant pour : <input type="checkbox"/> tous les États désignés <input type="checkbox"/> tous les États désignés sauf les États-Unis d'Amérique <input type="checkbox"/> les États-Unis d'Amérique seulement <input type="checkbox"/> les États indiqués dans le cadre supplémentaire</p>	
<p>Nom et adresse : <i>(Nom de famille suivi du prénom; pour une personne morale, désignation officielle complète. L'adresse doit comprendre le code postal et le nom du pays. Le pays de l'adresse indiquée dans ce cadre est l'État où le déposant a son domicile si aucun domicile n'est indiqué ci-dessous.)</i></p>	<p>Cette personne est :</p> <p><input type="checkbox"/> déposant seulement</p> <p><input type="checkbox"/> déposant et inventeur</p> <p><input type="checkbox"/> inventeur seulement <i>(Si cette case est cochée, ne pas remplir la suite.)</i></p>
Nationalité (nom de l'État) :	Domicile (nom de l'État) :
<p>Cette personne est déposant pour : <input type="checkbox"/> tous les États désignés <input type="checkbox"/> tous les États désignés sauf les États-Unis d'Amérique <input type="checkbox"/> les États-Unis d'Amérique seulement <input type="checkbox"/> les États indiqués dans le cadre supplémentaire</p>	
<p><input type="checkbox"/> D'autres déposants ou inventeurs sont indiqués sur une autre feuille annexe.</p>	

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



**Cadre n° V DÉSIGNATION D'ÉTATS**

Les désignations suivantes sont faites conformément à la règle 4.9.a) (cocher les cases appropriées; une au moins doit l'être) :

**Brevet régional**

- ☒ **AP** Brevet **ARIPO** : GH Ghana, GM Gambie, KE Kenya, LS Lesotho, MW Malawi, SD Soudan, SL Sierra Leone, SZ Swaziland, TZ République-Unie de Tanzanie, UG Ouganda, ZW Zimbabwe et tout autre État qui est un État contractant du Protocole de Harare et du PCT
- ☒ **EA** Brevet **eurasien** : AM Arménie, AZ Azerbaïdjan, BY Bélarus, KG Kirghizistan, KZ Kazakhstan, MD République de Moldova, RU Fédération de Russie, TJ Tadjikistan, TM Turkménistan et tout autre État qui est un État contractant de la Convention sur le brevet eurasienn et du PCT
- ☒ **EP** Brevet **européen** : AT Autriche, BE Belgique, CH et LI Suisse et Liechtenstein, CY Chypre, DE Allemagne, DK Danemark, ES Espagne, FI Finlande, FR France, GB Royaume-Uni, GR Grèce, IE Irlande, IT Italie, LU Luxembourg, MC Monaco, NL Pays-Bas, PT Portugal, SE Suède et tout autre État qui est un État contractant de la Convention sur le brevet européen et du PCT
- ☒ **OA** Brevet **OAPI** : BF Burkina Faso, BJ Bénin, CF République centrafricaine, CG Congo, CI Côte d'Ivoire, CM Cameroun, GA Gabon, GN Guinée, GW Guinée-Bissau, ML Mali, MR Mauritanie, NE Niger, SN Sénégal, TD Tchad, TG Togo et tout autre État qui est un État membre de l'OAPI et un État contractant du PCT (si une autre forme de protection ou de traitement est souhaitée, le préciser sur la ligne pointillée) .....

**Brevet national (si une autre forme de protection ou de traitement est souhaitée, le préciser sur la ligne pointillée) :**

- |  |   |
|--|---|
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>AE</b> Émirats arabes unis                        | <input checked="" type="checkbox"/> <b>LR</b> Liberia                               |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>AL</b> Albanie                                    | <input checked="" type="checkbox"/> <b>LS</b> Lesotho                               |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>AM</b> Arménie                                    | <input checked="" type="checkbox"/> <b>LT</b> Lituanie                              |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>AT</b> Autriche                                   | <input checked="" type="checkbox"/> <b>LU</b> Luxembourg                            |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>AU</b> Australie                                  | <input checked="" type="checkbox"/> <b>LV</b> Lettonie                              |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>AZ</b> Azerbaïdjan                                | <input checked="" type="checkbox"/> <b>MA</b> Maroc                                 |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>BA</b> Bosnie-Herzégovine                         | <input checked="" type="checkbox"/> <b>MD</b> République de Moldova                 |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>BB</b> Barbade                                    | <input checked="" type="checkbox"/> <b>MG</b> Madagascar                            |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>BG</b> Bulgarie                                   | <input checked="" type="checkbox"/> <b>MK</b> Ex-République yougoslave de Macédoine |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>BR</b> Brésil                                     | <input checked="" type="checkbox"/> <b>MN</b> Mongolie                              |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>BY</b> Bélarus                                    | <input checked="" type="checkbox"/> <b>MW</b> Malawi                                |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>CA</b> Canada                                     | <input checked="" type="checkbox"/> <b>MX</b> Mexique                               |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>CH et LI</b> Suisse et Liechtenstein              | <input checked="" type="checkbox"/> <b>NO</b> Norvège                               |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>CN</b> Chine                                      | <input checked="" type="checkbox"/> <b>NZ</b> Nouvelle-Zélande                      |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>CR</b> Costa Rica                                 | <input checked="" type="checkbox"/> <b>PL</b> Pologne                               |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>CU</b> Cuba                                       | <input checked="" type="checkbox"/> <b>PT</b> Portugal                              |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>CZ</b> République tchèque                         | <input checked="" type="checkbox"/> <b>RO</b> Roumanie                              |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>DE</b> Allemagne                                  | <input checked="" type="checkbox"/> <b>RU</b> Fédération de Russie                  |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>DK</b> Danemark                                   | <input checked="" type="checkbox"/> <b>SD</b> Soudan                                |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>DM</b> Dominique                                  | <input checked="" type="checkbox"/> <b>SE</b> Suède                                 |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>EE</b> Estonie                                    | <input checked="" type="checkbox"/> <b>SG</b> Singapour                             |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>ES</b> Espagne                                    | <input checked="" type="checkbox"/> <b>SI</b> Slovénie                              |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>FI</b> Finlande                                   | <input checked="" type="checkbox"/> <b>SK</b> Slovaquie                             |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>GB</b> Royaume-Uni                                | <input checked="" type="checkbox"/> <b>SL</b> Sierra Leone                          |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>GD</b> Grenade                                    | <input checked="" type="checkbox"/> <b>TJ</b> Tadjikistan                           |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>GE</b> Géorgie                                    | <input checked="" type="checkbox"/> <b>TM</b> Turkménistan                          |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>GH</b> Ghana                                      | <input checked="" type="checkbox"/> <b>TR</b> Turquie                               |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>GM</b> Gambie                                     | <input checked="" type="checkbox"/> <b>TT</b> Trinité-et-Tobago                     |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>HR</b> Croatie                                    | <input checked="" type="checkbox"/> <b>TZ</b> République-Unie de Tanzanie           |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>HU</b> Hongrie                                    | <input checked="" type="checkbox"/> <b>UA</b> Ukraine                               |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>ID</b> Indonésie                                  | <input checked="" type="checkbox"/> <b>UG</b> Ouganda                               |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>IL</b> Israël                                     | <input checked="" type="checkbox"/> <b>US</b> États-Unis d'Amérique                 |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>IN</b> Inde                                       | <input checked="" type="checkbox"/> <b>UZ</b> Ouzbékistan                           |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>IS</b> Islande                                    | <input checked="" type="checkbox"/> <b>VN</b> Viet Nam                              |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>JP</b> Japon                                      | <input checked="" type="checkbox"/> <b>YU</b> Yougoslavie                           |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>KE</b> Kenya                                      | <input checked="" type="checkbox"/> <b>ZA</b> Afrique du Sud                        |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>KG</b> Kirghizistan                               | <input checked="" type="checkbox"/> <b>ZW</b> Zimbabwe                              |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>KP</b> République populaire démocratique de Corée |   |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>KR</b> République de Corée                        |   |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>KZ</b> Kazakhstan                                 |   |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>LC</b> Sainte-Lucie                               |   |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>LK</b> Sri Lanka                                  |   |

Cases réservées pour la désignation d'États qui sont devenus parties au PCT après la publication de la présente feuille :

- ☒ **DZ** Algérie
- ☒ **AG** Antigua et Barbuda

**Déclaration concernant les désignations de précaution :** outre les désignations faites ci-dessus, le déposant fait aussi conformément à la règle 4.9.b) toutes les désignations qui seraient autorisées en vertu du PCT, à l'exception de toute désignation indiquée dans le cadre supplémentaire comme étant exclue de la portée de cette déclaration. Le déposant déclare que ces désignations additionnelles sont faites sous réserve de confirmation et que toute désignation qui n'est pas confirmée avant l'expiration d'un délai de 15 mois à compter de la date de priorité doit être considérée comme retirée par le déposant à l'expiration de ce délai. (La confirmation (y compris les taxes) doit parvenir à l'office récepteur dans le délai de 15 mois.)

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

Cadre n° VI REVENDEMENT DE PRIORITÉ		<input type="checkbox"/> D'autres revendications de priorité sont indiquées dans le cadre supplémentaire.		
Date de dépôt de la demande antérieure (jour/mois/année)	Numéro de la demande antérieure	Lorsque la demande antérieure est une :		
		demande nationale : pays	demande régionale : * office régional	demande internationale : office récepteur
(1) 10/05/99	99 05943	FRANCE		
(2)				
(3)				

☒ L'office récepteur est prié de préparer et de transmettre au Bureau international une copie certifiée conforme de la ou des demandes antérieures (seulement si la demande antérieure a été déposée auprès de l'office qui, aux fins de la présente demande internationale, est l'office récepteur) indiquées ci-dessus au(x) point(s) : VI

\* Si la demande antérieure est une demande ARIPO, il est obligatoire d'indiquer dans le cadre supplémentaire au moins un pays partie à la Convention de Paris pour la protection de la propriété industrielle pour lequel cette demande antérieure a été déposée (règle 4.10.b)ii)). Voir le cadre supplémentaire.

Cadre n° VII ADMINISTRATION CHARGÉE DE LA RECHERCHE INTERNATIONALE			
<b>Choix de l'administration chargée de la recherche internationale (ISA)</b> (si plusieurs administrations chargées de la recherche internationale sont compétentes pour procéder à la recherche internationale, indiquer l'administration choisie; le code à deux lettres peut être utilisé) : <b>ISA / EP</b>	<b>Demande d'utilisation des résultats d'une recherche antérieure; mention de cette recherche</b> (si une recherche antérieure a été effectuée par l'administration chargée de la recherche internationale ou demandée à cette dernière) : <div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <span>Date (jour/mois/année)</span> <span>Numéro</span> <span>Pays (ou office régional)</span> </div> <div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <span>15/03/2000</span> <span>FA 573407</span> <span>OEB</span> </div>		

Cadre n° VIII BORDEREAU; LANGUE DE DÉPÔT	
La présente demande internationale contient le nombre de feuilles suivant :  requête : <u>4</u> description (sauf partie réservée au listage des séquences) : <u>29</u> revendications : <u>10</u> abrégé : <u>4</u> dessins : <u>7</u> partie de la description réservée au listage des séquences : _____ Nombre total de feuilles : <u>51</u>	Le ou les éléments cochés ci-après sont joints à la présente demande internationale : 1. <input type="checkbox"/> feuille de calcul des taxes 2. <input type="checkbox"/> pouvoir distinct signé <u>à suivre (2)</u> 3. <input type="checkbox"/> copie du pouvoir général; numéro de référence, le cas échéant : 4. <input type="checkbox"/> explication de l'absence d'une signature 5. <input checked="" type="checkbox"/> document(s) de priorité indiqué(s) dans le cadre n° VI au(x) point(s) : 6. <input type="checkbox"/> traduction de la demande internationale en (langue) : 7. <input type="checkbox"/> indications séparées concernant des micro-organismes ou autre matériel biologique déposés 8. <input type="checkbox"/> listage des séquences de nucléotides ou d'acides aminés sous forme déchiffrable par ordinateur 9. <input checked="" type="checkbox"/> autres éléments (préciser) : Copie du Rapport de Recherche
Figure des dessins qui doit accompagner l'abrégé :	Langue de dépôt de la demande internationale : Français

Cadre n° IX SIGNATURE DU DÉPOSANT OU DU MANDATAIRE	
À côté de chaque signature, indiquer le nom du signataire et, si cela n'apparaît pas clairement à la lecture de la requête, à quel titre l'intéressé signe.	
WARCOIN Jacques	 <div style="border: 1px solid black; padding: 5px; text-align: center;"> <b>CABINET REGIMBEAU</b>              CONSEILS EN PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE              26, Avenue Kléber              75116 PARIS FRANCE           </div>

1. Date effective de réception des pièces supposées constituer la demande internationale :	2. Dessins : <input type="checkbox"/> reçus :  <input type="checkbox"/> non reçus :
3. Date effective de réception, rectifiée en raison de la réception ultérieure, mais dans les délais, de documents ou de dessins complétant ce qui est supposé constituer la demande internationale :	
4. Date de réception, dans les délais, des corrections demandées selon l'article 11.2) du PCT :	
5. Administration chargée de la recherche internationale (si plusieurs sont compétentes) : <u>ISA /</u>	6. <input type="checkbox"/> Transmission de la copie de recherche différée jusqu'au paiement de la taxe de recherche.

Date de réception de l'exemplaire original par le Bureau international :	Réservé au Bureau international
--	---------------------------------

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



## DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS (PCT)

<b>(51) Classification internationale des brevets <sup>7</sup> :</b>  <b>A61K</b>	<b>A2</b>	<b>(11) Numéro de publication internationale:</b> <b>WO 00/67697</b>  <b>(43) Date de publication internationale:</b> 16 novembre 2000 (16.11.00)
<b>(21) Numéro de la demande internationale:</b> PCT/FR00/01259  <b>(22) Date de dépôt international:</b> 10 mai 2000 (10.05.00)  <b>(30) Données relatives à la priorité:</b> 99/05943 10 mai 1999 (10.05.99) FR  <b>(71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US):</b> CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE (CNRS) [FR/FR]; 3, rue Michel-Ange, F-75794 Paris Cedex 16 (FR).  <b>(72) Inventeurs; et</b> <b>(75) Inventeurs/Déposants (US seulement):</b> HIRSCH, François [FR/FR]; 20, rue Victor Carnignac, F-94110 Arcueil (FR). DURRBACH, Antoine [FR/FR]; 1, rue des Champs, F-94170 Le Perreux (FR).  <b>(74) Mandataires:</b> MARTIN, Jean-Jacques etc.; Cabinet Régimbeau, 26, avenue Kléber, F-75116 Paris (FR).		<b>(81) Etats désignés:</b> AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, brevet ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), brevet eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).  <b>Publiée</b> <i>Sans rapport de recherche internationale, sera republiée dès réception de ce rapport.</i>
<b>(54) Title:</b> NUCLEIC ACID-ANTIBODY CONJUGATE FOR DELIVERING A FOREIGN NUCLEIC ACID IN CELLS  <b>(54) Titre:</b> CONJUGUE ACIDE NUCLEIQUE-ANTICORPS POUR DELIVRER UN ACIDE NUCLEIQUE ETRANGER DANS LES CELLULES  <b>(57) Abstract</b>  The invention concerns the techniques related to the insertion of foreign nucleic acid in cells. More particularly it concerns a DNA/antibody conjugate enabling an efficient foreign DNA expression <i>in vivo</i> or <i>in vitro</i> in protein form in target cells.  <b>(57) Abrégé</b>  La présente invention concerne les techniques relatives à l'introduction d'acide nucléique étranger dans des cellules. Plus particulièrement, la présente invention concerne un conjugué ADN/anticorps permettant l'expression efficace d'ADN étranger sous forme protéique dans des cellules cibles <i>in vivo</i> ou <i>in vitro</i> .		

# **UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION**

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AL	Albanie	ES	Espagne	LS	Lesotho	SI	Slovénie
AM	Arménie	FI	Finlande	LT	Lituanie	SK	Slovaquie
AT	Autriche	FR	France	LU	Luxembourg	SN	Sénégal
AU	Australie	GA	Gabon	LV	Lettonie	SZ	Swaziland
AZ	Azerbaïdjan	GB	Royaume-Uni	MC	Monaco	TD	Tchad
BA	Bosnie-Herzégovine	GE	Géorgie	MD	République de Moldova	TG	Togo
BB	Barbade	GH	Ghana	MG	Madagascar	TJ	Tadjikistan
BE	Belgique	GN	Guinée	MK	Ex-République yougoslave de Macédoine	TM	Turkménistan
BF	Burkina Faso	GR	Grèce			TR	Turquie
BG	Bulgarie	HU	Hongrie	ML	Mali	TT	Trinité-et-Tobago
BJ	Bénin	IE	Irlande	MN	Mongolie	UA	Ukraine
BR	Brésil	IL	Israël	MR	Mauritanie	UG	Ouganda
BY	Bélarus	IS	Islande	MW	Malawi	US	Etats-Unis d'Amérique
CA	Canada	IT	Italie	MX	Mexique	UZ	Ouzbékistan
CF	République centrafricaine	JP	Japon	NE	Niger	VN	Viet Nam
CG	Congo	KE	Kenya	NL	Pays-Bas	YU	Yougoslavie
CH	Suisse	KG	Kirghizistan	NO	Norvège	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	République populaire démocratique de Corée	NZ	Nouvelle-Zélande		
CM	Cameroun			PL	Pologne		
CN	Chine	KR	République de Corée	PT	Portugal		
CU	Cuba	KZ	Kazakhstan	RO	Roumanie		
CZ	République tchèque	LC	Sainte-Lucie	RU	Fédération de Russie		
DE	Allemagne	LI	Liechtenstein	SD	Soudan		
DK	Danemark	LK	Sri Lanka	SE	Suède		
EE	Estonie	LR	Libéria	SG	Singapour		

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION  
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété  
Intellectuelle  
Bureau international



(43) Date de la publication internationale  
16 novembre 2000 (16.11.2000)

PCT

(10) Numéro de publication internationale  
**WO 00/67697 A3**

(51) Classification internationale des brevets<sup>7</sup>: C12N 15/87,  
A61K 48/00

(21) Numéro de la demande internationale:  
PCT/FR00/01259

(22) Date de dépôt international: 10 mai 2000 (10.05.2000)

(25) Langue de dépôt: français

(26) Langue de publication: français

(30) Données relatives à la priorité:  
99/05943 10 mai 1999 (10.05.1999) FR

(71) Déposant (pour tous les États désignés sauf US):  
CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCI-  
ENTIFIQUE (CNRS) [FR/FR]; 3, rue Michel-Ange,  
F-75794 Paris Cedex 16 (FR).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement): **HIRSCH,**  
François [FR/FR]; 20, rue Victor Carmignac, F-94110 Ar-  
cueil (FR). **DURRBACH,** Antoine [FR/FR]; 1, rue des  
Champs, F-94170 Le Perreux (FR).

(74) Mandataires: **MARTIN,** Jean-Jacques etc.; Cabinet  
Régimbeau, 20, rue de Chazelles, F-75847 Paris Cedex 17  
(FR).

(81) États désignés (*national*): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ,  
BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK,  
DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID,  
IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT,  
LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL,  
PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ,  
UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(84) États désignés (*régional*): brevet ARIPO (GH, GM, KE,  
LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), brevet eurasien (AM,  
AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT,  
BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC,  
NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA,  
GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

**Publiée:**

— Avec rapport de recherche internationale.

(88) Date de publication du rapport de recherche  
internationale: 28 juin 2001

*En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abrégia-  
tions, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et  
abrégiactions" figurant au début de chaque numéro ordinaire de  
la Gazette du PCT.*

(54) Title: NUCLEIC ACID-ANTIBODY CONJUGATE FOR DELIVERING A FOREIGN NUCLEIC ACID IN CELLS

(54) Titre: CONJUGUE ACIDE NUCLEIQUE-ANTICORPS POUR DELIVRER UN ACIDE NUCLEIQUE ETRANGER DANS  
LES CELLULES

(57) Abstract: The invention concerns the techniques related to the insertion of foreign nucleic acid in cells. More particularly it  
concerns a DNA/antibody conjugate enabling an efficient foreign DNA expression *in vivo* or *in vitro* in protein form in target cells.

(57) Abrégé: La présente invention concerne les techniques relatives à l'introduction d'acide nucléique étranger dans des cellules.  
Plus particulièrement, la présente invention concerne un conjugué ADN/anticorps permettant l'expression efficace d'ADN étranger  
sous forme protéique dans des cellules cibles *in vivo* ou *in vitro*.

WO 00/67697 A3

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



### **Conjugué acide nucléique-anticorps pour délivrer un acide nucléique étranger dans les cellules**

La thérapie génique a pour objet de corriger un défaut génétique par intervention sur l'ADN. Elle peut être réalisée selon deux approches distinctes : soit comme une correction du génotype par réparation de l'anomalie génique, soit par correction du phénotype par greffe d'une version normale du gène permettant ainsi de suppléer le gène défectueux toujours présent. La thérapie génique s'applique aussi bien au traitement des maladies génétiques constitutionnelles que acquises. Ainsi, un certains nombres de maladies génétiques constitutionnelles sont candidates à une thérapie génique ; on peut citer, entre autres, la mucoviscidose, la myopathie de Duchenne ou le déficit en adénosine désaminase (Cournoyer *et al.*, 1991, "Gene transfer of adenosine deaminase into primitive human hemotopoetic progenitor cells", Human Gene Therapie, 2 : 203). La thérapie génique s'applique aussi à la lutte contre les maladies acquises dont les maladies candidates sont les cancers et les maladies infectieuses et virales (SIDA, hépatites).

Dans la thérapie des cancers, les premières expériences effectuées avec les lymphocytes infiltrant les tumeurs (TIL : tumor infiltrating lymphocytes) ont démontré que des cellules pouvaient être armées avec des facteurs cytotoxiques (TNF, tumor necrosis factor) (Rosenberg *et al.* 1990, "Gene transfer into humans : immunotherapy of patients with advanced melanoma using infiltrating lymphocytes modified by retroviral gene transduction" N. Eng. J. Med. 323 :570-578) ou être dopées avec des cytokines ; ainsi Golumbek et ses collaborateurs ont obtenu un succès thérapeutique sur des cancers rénaux de souris traités par des cellules produisant de l'interleukine 4 (Golumbek *et al.* 1991, Science 254 :713-716).

La thérapie génique effectuée sur les cellules somatiques d'un individu affecté d'un défaut génétique pose de multiples problèmes méthodologiques, le gène réparé ou greffé devant être exprimé

normalement de façon régulière, c'est-à-dire au bon endroit, au bon moment et en quantité normale adaptée aux besoins ; la correction ou la greffe devant être indéfiniment stable.

Parmi les stratégies de transfert génique somatique *ex vivo* développées pour tenter de cibler spécifiquement et efficacement les cellules d'intérêt, il convient de citer : (i) les stratégies utilisant les méthodes physiques telles que la co-précipitation par le phosphate de calcium, l'électroporation, la micro-injection, la fusion de protoplastes, la biolistique ou les véhicules artificiels tels les liposomes et les ligands de récepteur par exemple ; (ii) et celles faisant appel aux vecteurs viraux (rétrovirus, adénovirus, AAV, HSV) (Ragot *et al.*, 1993 Nature 361 : 647-650). Parmi les stratégies de transfert génique somatique *in vivo* développées peuvent être citées les véhicules cellulaires ayant préalablement reçus le gène *ex vivo* (cellules souches hématopoïétiques, lymphocytes, hépatocytes, cellules endothéliales, cellules épithéliales), les vecteurs viraux, l'injection intra-musculaire d'ADN nu et les véhicules artificiels.

Une des difficultés actuelles de la thérapie génique porte sur le ciblage *in vivo* des cellules à modifier. Actuellement, seul un petit nombre d'approches virales ou synthétiques ont été développées ; elles exploitent essentiellement les interactions ligand-récepteur (Michael et Curiel, 1994, « Strategies to achieved targeted gene delivery via the receptor-mediated endocytosis pathway », Gene Therapy 1:223).

Différentes approches utilisant un vecteur viral ont ainsi été expérimentées. Une première approche a consisté à ponter via la streptavidine, des anticorps biotinylés dirigés contre une structure cellulaire cible à des anticorps également biotinylés dirigés contre les structures de l'enveloppe rétrovirale et donc associés à un rétrovirus (Roux *et al.*, 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86 :9079-9083). Une fois liés aux cellules, les vecteurs rétroviraux sont internalisés par endocytose et sont capables d'échapper au système lysosome-endosome par un mécanisme de transfert de l'endosome vers le cytoplasme, évitant ainsi la dégradation de l'ADN transfecté et

permettant l'entrée dudit ADN dans le noyau cellulaire. Cette approche a révélé une absence de spécificité du ciblage *in vivo* due à l'accrochage non spécifique des vecteurs rétroviraux à la surface cellulaire. Une deuxième approche virale a été développée qui utilise des virus ectopiques modifiés pour porter une protéine-ligand d'enveloppe chimérique à leur surface (Kasahara *et al.* 1987 « Receptor-mediated *in vitro* gene transformation by a soluble DNA carrier system » J. Biol. Chem. 262 :4429). Enfin, il convient de citer l'approche développée par Neda *et al.* (1991 « Chemical modification of an ecotropic murine leukemia virus results in redirection of its target cell specificity » J. Biol. Chem. 266 : 14143).

Des approches synthétiques non virales ont également été expérimentées. Elles sont réalisées par la formation d'un complexe entre un ligand capable de se lier à la surface de la cellule cible et avec l'ADN à transférer. Il convient de citer tout d'abord les approches utilisant les véhicules artificiels tels les liposomes recouverts d'anticorps (immunoliposomes); ce type d'approche ne s'est pas, à présent, avérée satisfaisante car les immunoliposomes présentent une activité non spécifique vraisemblablement suite à l'accrochage non spécifique des liposomes aux membranes cellulaires. Il est également apparu que l'efficacité de transfert de gène contenu dans les liposomes reste modeste bien qu'il est supposé que la dégradation associée aux endosomes est évitée par l'utilisation des liposomes. Des approches alternatives utilisant des composés qui retiennent l'aptitude à interagir spécifiquement avec des récepteurs cellulaires de surface ont été développées. En effet, différents récepteurs naturellement présents à la surface des cellules ont la propriété de s'internaliser dans la cellule après fixation sur leur ligand ; ainsi la transférine, dont le récepteur a une répartition tissulaire ubiquitaire, a fait l'objet de nombreuses expériences (transférinfection) (Zenke *et al.*, 1990, Proc.Natl.Acad.Sci. USA, 87 :3655-3659). Une autre alternative a consisté à cibler des asialoglycoprotéines présentes à la surface des hépatocytes (Wu *et al.*, 1991, J. Biol. Chem. 266 :14338-14342). Enfin une autre technique

appelée « antifection » développée par l'un des inventeurs de la présente invention (Hirsch *et al.* « Antifection : a new method to targeted gene transfection » 1993, Transpl. Proc. 25 : 138) a été décrite ; cette technique consiste à préparer un vecteur anticorps-ADN  
5 qui est délivré à une population cellulaire sélectionnée (Brevet US 5 428 132).

Outre les problèmes de ciblage du vecteur, une autre difficulté à surmonter dans les expériences de thérapie génique se situe dans le transfert, à l'intérieur des cellules, de l'ADN à transfecter et de la  
10 protection de cet ADN contre les activités nucléasiques des compartiments cellulaires lysosomiaux afin d'obtenir une expression conséquent du transgène.

Différentes approches ont été développées pour répondre à ce problème ; une efficacité accrue de l'expression du transgène a ainsi  
15 pu être obtenue en utilisant des agents lysosomotropiques tels la chloroquine (Zenke *et al.*, 1990, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87 :3655-3659 ; Luthman *et al.*, 1983, Nucleic Acids Res. 11 : 1295) ; de tels agents réduisent la destruction lysosomiale de l'ADN en augmentant le pH des endosomes et en inhibant le transfert du matériel internalisé  
20 vers les lysosomes. Une autre approche consiste à utiliser des domaines protéiques ayant une activité de translocation cellulaire. La propriété de ces domaines est mise à profit pour faciliter l'échappement des acides nucléiques transfectés hors des vésicules endosomiales afin d'augmenter l'efficacité du transfert d'acide nucléique vers le noyau  
25 (Fominaya et Wels, 1995, J. Biol. Chem. 271 :10560). La demande internationale de brevet WO 94/04696 décrit un système de transfert d'acide nucléique composé d'un domaine de translocation provenant de l'exotoxine A de *Pseudomonas aeruginosa* ; l'efficacité de transfection et la spécificité d'un tel système de transfert apparaît très bas. Une autre  
30 demande internationale de brevet WO 96/13599 décrit également un système de transfert d'acide nucléique composé d'une protéine monomérique recombinante comportant différents domaines

fonctionnels dont un domaine de translocation dérivés de toxines, de préférence bactériennes, telle que l'exotoxine A.

Les stratégies de thérapie génique préalablement évoquées nécessitent des préparations laborieuses ou du matériel sophistiqué et peuvent présentées un certain risque biologique. Il existe à l'heure actuelle un besoin de développer un système de transfert simple et efficace d'acides nucléiques qui permette d'introduire spécifiquement dans les cellules cibles des acides nucléiques exprimés efficacement. A ce titre, la technique d'antifection (brevet US 5 428 132), basée sur l'utilisation d'anticorps pour cibler des séquences d'ADN d'intérêt dans des cellules cibles, est extrêmement prometteuse car les anticorps constituent un outil extrêmement efficace pour diriger le vecteur de transfert vers un type cellulaire particulier du fait de la grande affinité et de la grande spécificité des anticorps; de plus la multitude d'anticorps monoclonaux et polyclonaux disponibles dirigés contre les nombreuses structures cellulaires tumorales ou normales donne à cette technologie un réel intérêt. Néanmoins la technique d'antifection décrite dans le brevet US 5 428 132 bien qu'elle permette un ciblage efficace, ne permet pas d'obtenir une expression conséquente du transgène transfecté.

C'est donc l'objet de la présente invention d'améliorer le taux d'expression du transgène transfecté dans les cellules cibles en utilisant la technologie d'antifection. Ces améliorations portent sur l'adjonction d'un domaine de translocation au complexe ADN-anticorps et/ou à l'utilisation de protéine de liaison à l'ADN pour coupler de manière non covalente l'ADN au complexe et/ou pour augmenter l'efficacité du transfert et/ou à l'adjonction d'un peptide clivable. Ces améliorations permettent de manière spectaculaire et inattendue d'augmenter de 2 à 10 fois le taux d'expression du transgène dans la cellule cible.

La présente invention concerne donc un conjugué pour le transfert d'une molécule d'acide nucléique dans une cellule caractérisé en ce qu'il comprend une molécule d'acide nucléique, un domaine de

translocation et un anticorps spécifique d'un antigène de surface de ladite cellule, tel que ledit conjugué est transfecté efficacement dans ladite cellule.

Selon un premier mode de réalisation de l'invention (A), le conjugué selon l'invention est caractérisé en ce que lesdits molécule d'acide nucléique, domaine de translocation et anticorps sont conjugués au moyen d'au moins un agent de pontage.

Selon un mode préféré de réalisation (A), le conjugué se caractérise en ce qu'il comprend en outre un peptide clivable par au moins une enzyme glycolytique et/ou protéolytique, ledit anticorps étant lié audit domaine de translocation via ledit peptide clivable. Dans ce conjugué, l'anticorps et ledit peptide clivable peuvent être liés soit (i) de manière covalente via un agent de pontage sélectionné de préférence dans le groupe composé de la benzoquinone, de l'EDC, de l'APDP ; soit (ii) à une molécule de type avidine au moyen d'un agent de pontage qui peut être identique ou différent et qui est sélectionné de préférence dans le groupe composé de la biotine, la benzoquinone, de l'EDC, de l'APDP. Le domaine de translocation de ce composé est lié audit peptide clivable par une liaison chimique covalente. On entend désigner par liaison chimique covalente de préférence une liaison de type peptidique ; selon un mode particulier de réalisation le peptide correspondant au domaine de translocation lié au peptide clivable est obtenu par synthèse chimique.

Dans ce mode de réalisation le domaine de translocation peut être lié à une molécule d'acide nucléique soit :

i) au moyen d'un agent de pontage qui est de préférence l'APDP ; selon ce mode de réalisation un mode encore plus préféré de réalisation du conjugué de l'invention se caractérise en ce que ledit anticorps est lié audit peptide clivable par une liaison covalente au moyen dudit agent de pontage EDC, ledit peptide clivable étant lié audit domaine de translocation par une liaison covalente au moyen d'une liaison chimique, ledit domaine de translocation étant lié audit acide

nucléique par une liaison covalente au moyen dudit agent de pontage APDP.

- ii) via une molécule de liaison aux acides nucléiques, ladite molécule de liaison aux acides nucléiques étant liée audit domaine de
- 5 translocation par une liaison covalente au moyen d'un agent de pontage qui est de préférence l'APDP. Selon ce mode de réalisation, un mode de réalisation encore plus préféré consiste en ce que ledit anticorps est lié audit peptide clivable par une liaison covalente au moyen dudit agent de pontage EDC, ledit peptide clivable étant lié
- 10 audit domaine de translocation par une liaison covalente au moyen d'une liaison chimique, ledit domaine de translocation étant lié à ladite molécule de liaison aux acides nucléiques par une liaison covalente au moyen dudit agent de pontage APDP, ladite molécule de liaison aux acides nucléiques liant ledit acide nucléique par une liaison non-
- 15 covalente.

Selon un deuxième mode de réalisation (B), l'invention concerne un conjugué caractérisé en ce qu'il comprend en outre une molécule de liaison aux acides nucléiques, tel que ledit domaine de translocation, ledit anticorps et ladite molécule de liaison aux acides nucléiques sont

20 liés à une molécule de type avidine au moyen d'un agent de pontage qui peut être identique ou différent, ladite molécule de liaison aux acides nucléiques étant liée à ladite molécule d'acide nucléique.

Selon un autre mode de réalisation (B), l'invention concerne un conjugué caractérisé en ce qu'il comprend en outre une molécule de

25 liaison aux acides nucléiques et un peptide clivable par au moins une enzyme glycolytique et/ou protéolytique, tel que ledit domaine de translocation, ledit anticorps et ledit peptide clivable sont liés à une molécule de type avidine au moyen d'un agent de pontage qui peut être identique ou différent, ladite molécule de liaison aux acides nucléiques

30 étant liée à ladite molécule d'acide nucléique, ladite molécule de liaison aux acides nucléiques étant liée audit peptide clivable et à ladite molécule d'acide nucléique.

Selon un autre aspect (C), l'invention concerne un conjugué pour le transfert d'une molécule d'acide nucléique dans une cellule caractérisé en ce qu'il comprend une molécule d'acide nucléique, un anticorps spécifique d'un antigène de surface de cellule et une  
5 molécule de liaison aux acides nucléiques tel que ledit conjugué est transfecté efficacement dans ladite cellule ; ce conjugué se caractérise en ce que ladite molécule d'acide nucléique, ledit anticorps et ladite molécule de liaison aux acides nucléiques sont liés à une molécule de type avidine au moyen d'un agent de pontage qui peut être identique  
10 ou différent, ladite molécule de liaison aux acides nucléiques étant liée à ladite molécule d'acide nucléique.

Selon un mode de réalisation (C) préféré le conjugué précédent se caractérise en ce qu'il comprend en outre un peptide clivable par au moins une enzyme glycolytique et/ou protéolytique, ledit anticorps  
15 étant lié à ladite molécule de liaison aux acides nucléiques via ledit peptide clivable ; dans ce conjugué, ledit anticorps et ledit peptide clivable sont liés soit (i) de manière covalente via un agent de pontage sélectionné de préférence dans le groupe composé de la benzoquinone, de l'EDC, de l'APDP, ou soit (ii) via une molécule de type avidine au  
20 moyen d'un agent de pontage qui peut être identique ou différent et sélectionné de préférence dans le groupe composé de la biotine, la benzoquinone, de l'EDC, de l'APDP. Dans ce conjugué, ledit peptide clivable est lié à ladite molécule de liaison aux acides nucléiques au moyen d'un agent de pontage qui est de préférence APDP, ladite  
25 molécule de liaison aux acides nucléiques liant ledit acide nucléique par une liaison non-covalente.

Selon un mode de réalisation (D), l'invention porte sur un conjugué pour le transfert d'une molécule d'acide nucléique dans une cellule caractérisé en ce qu'il comprend une molécule d'acide  
30 nucléique, un anticorps spécifique d'un antigène de surface de cellule et un peptide clivable par au moins une enzyme glycolytique et/ou protéolytique tel que ledit conjugué est transfecté efficacement dans ladite cellule. Dans ce conjugué, ledit anticorps et ledit peptide clivable



sont liés soit (i) de manière covalente via un agent de pontage sélectionné de préférence dans le groupe composé de la benzoquinone, de l'EDC, de l'APDP, soit (ii) à une molécule de type avidine au moyen d'un agent de pontage qui peut être identique ou différent sélectionné de préférence dans le groupe composé de la biotine, la benzoquinone, de l'EDC, de l'APDP. Dans ce conjugué, ledit peptide clivable est lié audit acide nucléique soit (i) par une liaison covalente au moyen d'un agent de pontage qui est de préférence l'APDP, soit (ii) via une molécule de liaison aux acides nucléiques, ladite molécule de liaison aux acides nucléiques étant liée audit peptide clivable par une liaison covalente au moyen d'un agent de pontage qui est de préférence l'APDP. Selon un mode particulièrement préféré de l'invention ledit conjugué comprend en outre un domaine de translocation qui est éventuellement lié de manière covalente au moyen d'un agent de pontage à ladite molécule d'acide nucléique et/ou à ladite molécule de liaison aux acides nucléiques. Selon un autre mode de réalisation, ledit domaine de translocation est présent au sein du conjugué sans y être lié covalamment.

On entend désigner par peptide clivable, un peptide comportant une ou plusieurs séquences clivables par des enzymes glycolytiques et/ou protéolytiques de préférence endosomiales et/ou lysosomiales telles par exemple les cathepsines et la trypsine. Selon un mode particulier de réalisation, le peptide clivable de l'invention comporte au moins un site cathepsine B et/ou un site cathepsine D. De manière préférée, le peptide clivable comporte un site cathepsine B et un site cathepsine D séparés par au moins un acide aminé, de préférence par au moins deux acides aminés tel par exemple la glycine ; le peptide clivable de l'invention présente la séquence :  $X_1$ - $X_2$ -F-Y-G-G-F-R- dans laquelle G représente la glycine,  $X_1$  et  $X_2$  des acides aminés permettant l'accrochage ou liaison chimique de l'anticorps telle par exemple deux lysines (K). F-Y représente le dipeptide composé des acides aminés phénylalanine-tyrosine qui est clivable par la cathepsine D ; cette séquence peut éventuellement être remplacée par L-Y (leucine-

tyrosine), Y-L (tyrosine-leucine) ou F-F (phénylalanine-phénylalanine). FR représente le dipeptide composé des acides aminés phénylalanine-arginine qui est clivable par la cathepsine B.

L'agent de pontage permet de lier de manière chimique (covalente),  
5 électrostatique, non-covalente tout ou partie des composants du conjugué. Parmi les agents de pontage susceptibles d'être utilisés dans la présente invention, il convient de citer la benzoquinone, la carbodiimide et plus particulièrement l'EDC (1-Ethyl-3[3-Diméthylaminopropyl]carbodiimide hydrochloride), la dimaléimide,  
10 l'acide dithio-bis-nitrobenzoïque (DTNB), le N-succinimidyl-S-acétylthioacétate (SATA), les agents pontants possédant un ou plusieurs groupements phénylazide réagissant avec les ultraviolets (U.V.) et de préférence le N-[4-(azidosalicylamino)butyl]-3'-(2'-pyridyldithio)propionamide (APDP), le N-succinimidyl-3-(2'-pyridyldithio)propionate (SPDP), le 6-hydrazinonicotimide (HYNIC), la  
15 biotine; la benzoquinone, l'EDC, l'APDP et la biotine étant les agents de coupage préféremment utilisés. Par "molécule de type avidine", on entend désigner toutes molécules se liant avec une forte affinité à la biotine, et de préférence la molécule tétravalente d'avidine, la  
20 streptavidine, la neutravidine.

Selon un mode préféré de réalisation de l'invention, le conjugué précédemment décrit selon les différents modes de réalisation de l'invention est caractérisé en ce que ledit agent de pontage est sélectionné dans le groupe composé de la benzoquinone, de la biotine,  
25 des carbodiimides, des agents pontants présentant au moins un groupement phénylazide réagissant aux ultra-violets (UV). Selon un mode préféré, l'agent de pontage est sélectionné dans le groupe composé de la benzoquinone, de la biotine, de l'EDC, l'APDP.

Selon un autre mode préféré de réalisation de l'invention, le  
30 conjugué précédemment décrit selon le deuxième mode de réalisation (B) est caractérisé en ce que l'agent de pontage qui lie ledit domaine de translocation et ledit anticorps à la molécule de type avidine est la biotine et, l'agent de pontage qui lie ladite molécule de liaison aux

acides nucléiques à la molécule de type avidine est la benzoquinone. Selon un autre mode préféré de réalisation de l'invention, le conjugué précédemment décrit selon le deuxième mode de réalisation (B) est caractérisé en ce que l'agent de pontage qui lie ledit domaine de translocation, ledit anticorps et ladite molécule de liaison aux acides nucléiques est la biotine. Selon un mode particulier de réalisation de l'invention, le conjugué précédemment décrit selon le deuxième mode de réalisation (B) se caractérise en ce que le domaine de translocation et la molécule de liaison aux acides nucléiques forment une protéine de fusion. Par protéine de fusion, on entend désigner une protéine qui renferme des domaines protéiques provenant de protéines différentes et codées par une même molécule d'ADN obtenue par la technologie de l'ADN recombinant. Cette protéine de fusion et l'anticorps sont liés à une molécule de type avidine aux moyens d'agents de pontage qui sont identiques ou différents, ladite protéine de fusion étant liée à ladite molécule d'acide nucléique par son domaine de liaison aux acides nucléiques.

Selon un autre mode préféré de réalisation de l'invention, le conjugué précédemment décrit selon le deuxième mode de réalisation (B) et qui comprend un peptide clivable est caractérisé en ce que l'agent de pontage qui lie ledit domaine de translocation et ledit anticorps à la molécule de type avidine est la biotine et, l'agent de pontage qui lie ledit peptide clivable à la molécule de type avidine est la benzoquinone. Selon un autre mode préféré de réalisation de l'invention, le conjugué précédemment décrit selon le deuxième mode de réalisation (B) est caractérisé en ce que l'agent de pontage qui lie ledit domaine de translocation, ledit anticorps et ledit peptide clivable est la biotine.

Selon un autre mode préféré de réalisation, le conjugué précédemment décrit selon un autre mode de réalisation (C) de l'invention est caractérisé en ce que l'agent de pontage qui lie ledit anticorps à la molécule de type avidine est la biotine, et l'agent de pontage qui lie ladite molécule de liaison aux acides nucléiques à la

molécule de type avidine est la benzoquinone. Selon un autre mode préféré de réalisation, le conjugué précédemment décrit est caractérisé en ce que ledit agent de pontage est la biotine.

Le conjugué selon l'invention se caractérise en ce que la molécule  
5 d'acide nucléique du conjugué est choisie parmi l'ADN simple brin, l'ADN double brin, l'ARN simple brin, l'ARN double brin, l'hybride ARN/ADN. Selon un mode préféré de réalisation, ladite molécule d'acide nucléique est de l'ADN double brin ou de l'ARN simple brin qui  
10 code pour un produit protéique d'intérêt qui s'exprime efficacement dans ladite cellule. Les produits protéiques d'intérêt sont choisis dans un groupe composé des interleukines, des cytokines, des lymphokines, des chémokines, des facteurs de croissance, des protéines tueuses, des protéines qui permettent de lever la chimiorésistance et des enzymes de restriction ; les interleukines, cytokines et lymphokines sont  
15 choisies dans un groupe composé de préférence des interleukines Il-1, Il-2, Il-3, Il-4, Il-5, Il-6, Il-7, Il-8, Il-9, Il-10, Il-11, Il-12, Il-13, Il-14, Il-15, Il-16, Il-17 et Il-18, des interférons  $\alpha$ -IFN,  $\beta$ -IFN et  $\gamma$ -IFN ; de préférence le produit protéique d'intérêt est l'interleukine 2. Les facteurs de croissance sont de préférence les facteurs stimulateurs des  
20 colonies (colony stimulating factors) G-CSF, GM-CSF, M-CSF) et l'érythropoïétine, il convient également de citer les facteurs de croissance qui interagissent en les inhibant, avec les facteurs de transcription nucléaires tels NF-KB ; ces facteurs de croissance ont fait l'objet de la demande de brevet FR 98 14858. Les protéines tueuses  
25 sont choisies parmi le groupe composé des kinases, et de préférence la thymidine kinase, et des protéines pro-apoptotiques ; on entend désigner par protéines pro-apoptotiques les protéines qui interviennent dans l'apoptose ou promeuvent l'apoptose. Parmi les protéines pro-apoptotiques, il convient de citer les protéines de la famille de Bcl2, et  
30 plus particulièrement les protéines BIK (Bcl2-interacting protein), BAX (Oltvai *et al.* 1993, Cell 74 :609-619), BAK (Chittenden *et al.* 1995, Nature 374 : 733-736 ; Kiefer *et al.* 1995, Nature 374 : 736-739) et BID (BH3-interacting domain death agonist) (Wang *et al.* 1996, Genes Dev.

10 : 2859-2869); de préférence le produit protéique d'intérêt est la protéine BAX. Parmi les protéines pro-apoptotiques, il convient également de citer les caspases, la protéine AIF (apoptosis-inducing factor) (Susin *et al.* 1999, Nature 397 : 441-446) et les protéines de la  
5 famille du facteur nécrosant des tumeurs (TNF, tumor necrosing factor), et plus particulièrement le TNF lui-même (Old 1985, Science 230 : 630-632), la protéine FASL (FAS-ligand) (Takahashi *et al.* 1994, Int. Immun. 6 :1567-1574).

Selon un autre mode de réalisation de l'invention, la molécule  
10 d'acide nucléique est un ARN antisens.

Selon l'invention, le conjugué selon l'invention se caractérise en ce que la molécule de liaison aux acides nucléiques lie ladite molécule d'acide nucléique par une liaison non-covalente. La molécule de liaison aux acides nucléiques est soit un polymère polycationique soit une  
15 protéine de liaison aux acides nucléiques : (i) le polymère polycationique est choisi parmi la poly-L-lysine, la poly-D-lysine, le polyéthylènimine, la polyamidoamine, la polyamine et toutes polycations libres d'origine chimique ; de préférence, le polymère polycationique est la poly-L-lysine ; (ii) la protéine de liaison aux acides  
20 nucléiques est choisie parmi les histones, la protamine, l'ornithine, la putrescine, la spermidine, la spermine, les facteurs de transcription, les protéines homéobox ; de préférence, la protéine de liaison aux acides nucléiques est une protamine et/ou une histone.

Lors de la préparation du conjugué selon l'invention, qui comprend  
25 un domaine de liaison aux acides nucléiques tels que la protamine et/ou les histones, le domaine de liaison est de préférence ajouté en excès. Ce domaine de liaison est ensuite présent en excès dans le conjugué. Par le terme "en excès", on entend désigner que le domaine de liaison aux acides nucléiques et les autres composants du conjugué  
30 ne sont pas présents en quantité stoechiométrique.

La présence en large excès de molécule de liaison aux acides nucléiques tels que la protamine ou les histones permet et favorise le compactage de la molécule d'acides nucléiques, permettant ainsi une

transfection efficace de la molécule d'acide nucléique dans la cellule et plus particulièrement une translocation et un ciblage de la molécule d'acide nucléique dans le noyau de la cellule. Par ailleurs, le compactage de la molécule d'acide nucléique de l'invention par une  
5 molécule de liaison aux acides nucléiques telle que la protamine ou les histones permet de protéger ladite molécule d'acides nucléiques des dégradations par les nucléases cellulaires et extracellulaires. L'utilisation de la protamine et des histones pour favoriser la transfection et l'expression de molécule d'acide nucléique est depuis  
10 longtemps connue de l'homme de l'art (Wienhues et al. (1987) et Dubes et Wegrzyn (1978)).

Le conjugué selon l'invention se caractérise en ce que ledit domaine de translocation dérive d'une toxine bactérienne ou virale sans contenir la partie de la toxine qui lui confère son effet toxique. La  
15 toxine bactérienne ou virale est choisie parmi: l'exotoxine A de *Pseudomonas*, la toxine diphtérique, la toxine cholérique, la toxine anthrox de *Bacillus*, la toxine Pertussis, la toxine Shiga de *Shigella*, la toxine apparentée à la toxine Shiga, les toxines d'*Escherichia coli*, la colicine A, la d-endotoxine, l'hémagglutinine d'*Haemophilus A*. Dans  
20 un mode préféré de réalisation, le domaine de translocation est l'exotoxine A de *Pseudomonas aeruginosa*. Dans un autre mode préféré de réalisation, le domaine de translocation est le fragment B non toxique de la toxine Shiga de *Shigella*.

Dans un autre mode préféré de réalisation, le domaine de  
25 translocation est un fragment de l'hémagglutinine d'*Haemophilus A*. Ce fragment de l'hémagglutinine de l'influenza A (HA) peut être modifié à son extrémité C-terminale par l'adjonction d'une cystéine ou par l'adjonction d'une courte séquence peptidique se terminant par une cystéine afin de faire réagir avec cette cystéine l'agent de couplage, qui  
30 est de préférence l'APDP.

Le conjugué selon l'invention est caractérisé en ce que l'anticorps est un anticorps monoclonal ou un anticorps polyclonal spécifique d'un antigène de surface membranaire. Selon un des modes préférés

de réalisation de l'invention, l'anticorps se lie spécifiquement à l'antigène G250 caractéristique des carcinomes des cellules rénales humaines (RCC). Selon un mode préféré de réalisation de l'invention, l'anticorps de l'invention est l'anticorps G250 décrit par Oosterwijk *et al.* (1986, Int. J. Cancer. 38 :489-494) et qui a fait l'objet de la demande de brevet internationale WO 88/08854. Selon un autre mode préféré de réalisation, l'anticorps selon la présente invention est un anticorps monoclonal 5C5 obtenu par l'hybridome 5C5 déposé à la CNCM sous le N°I-2184. L'anticorps selon l'invention est soit sous la forme d'un anticorps simple chaîne, soit sous la forme d'un anticorps chimérique ou d'un anticorps humanisé. Selon un mode particulier de réalisation, l'anticorps est un fragment d'anticorps, de préférence un fragment F(ab')<sub>2</sub>, Fab' ou Fv.

Le conjugué ADN-anticorps de la présente invention peut être administré selon diverses voies connues par les personnes de l'art. Par exemple, il peut être administré par voie intraveineuse, par voie intrapéritonéale, par voie intramusculaire, par voie sous-cutanée, par voie intra-tumorale, par voie anale ou rectale.

Enfin, l'invention porte sur un conjugué tel que décrit précédemment à titre de médicament. Plus particulièrement, l'invention porte sur un conjugué tel que décrit précédemment à titre de médicament pour la thérapie génique et plus précisément pour le traitement des maladies génétiques acquises ou constitutionnelles. Selon l'invention, les maladies acquises sont sélectionnées dans le groupe composé des cancers et des maladies infectieuses. Parmi les cancers selon l'invention, on peut citer, le carcinome des cellules rénales (RCC), le mélanome, la leucémie myéloïde chronique, la leucémie myéloïde aiguë, le lymphome de Burkitt, le cancer pulmonaire à petites cellules, le neuroblastome, le rétinoblastome, le glioblastome, l'hépatocarcinome, rhabdomyosarcome, l'adénocarcinome gastrique, le carcinome colique, le cancer ovarien, le carcinome mammaire, le cancer de l'utérus, le carcinome du testicule. De préférence, l'invention porte sur un conjugué tel que décrit

précédemment à titre de médicament pour le traitement du carcinome des cellules rénales (RCC). Parmi les maladies infectieuses on peut citer de préférence le SIDA et les hépatites.

Selon l'invention, les maladies constitutionnelles sont sélectionnées  
5 de préférence dans le groupe composé des myopathies, et plus particulièrement de la myopathie de Duchenne (DM), la myopathie de Steinert et l'amyotrophie spinale (SMA), la mucoviscidose, la sclérose latérale amyotrophique (SLA), l'hémophilie, les hémoglobinopathies, les maladies neurodégénératives telles la maladie d'Alzheimer, la maladie  
10 de Parkinson et la chorée de Huntington, la maladie de Gaucher, la maladie de Lesch-Nyhan, les déficiences immunitaires liées à un déficit en adénosine désaminase ou en purine nucléoside phosphorylase, l'emphysème pulmonaire, l'hypercholestérolémie.

Il est évident que le composé selon l'invention a de multiples  
15 applications selon la nature de la séquence d'ADN et de la nature de l'anticorps sélectionnés. Ces multiples applications sont facilement envisageables par une personne de l'art et ne peuvent être mentionnées de manière exhaustive.

L'invention porte également sur une composition pharmaceutique  
20 notamment pour le traitement des maladies par thérapie génique qui comprend une quantité thérapeutiquement efficace d'un conjugué selon l'invention et un véhicule pharmaceutiquement acceptable.

La présente invention porte également sur un procédé de transfert  
d'une molécule d'acide nucléique dans une cellule, caractérisé en ce  
25 qu'on met en contact avec ladite cellule le conjugué selon l'invention de façon à transfecter ladite cellule avec ledit conjugué. De préférence, la molécule d'acide nucléique code pour un produit protéique d'intérêt qui s'exprime efficacement dans ladite cellule transfectée.

Selon un mode préféré de réalisation de l'invention, la molécule  
30 d'acide nucléique est de l'ADN double brin codant pour un produit protéique d'intérêt. La présente invention fournit donc un système efficace qui permet le transit de la molécule d'ADN double brin à travers la membrane cellulaire cytoplasmique, le transport vers le



noyau, l'entrée dans le noyau et le maintien à l'état fonctionnel de cette molécule dans le noyau. La persistance de l'expression du produit protéique codé par la molécule d'ADN est obtenue soit par l'intégration stable de la molécule d'ADN dans l'ADN chromosomique de la cellule cible, soit par maintien de la molécule d'ADN sous la forme d'un  
5 réplicon extrachromosomique. C'est donc un des objets de la présente invention de fournir un procédé caractérisé en ce que ladite molécule d'acide nucléique se maintient sous la forme d'un réplicon extrachromosomique dans ladite cellule. Selon un autre mode de  
10 réalisation, la présente invention fournit un procédé caractérisé en ce que ladite molécule d'acide nucléique s'intègre dans l'ADN génomique et/ou mitochondrial de ladite cellule transfectée.

La cellule ciblée par le composé de la présente invention est une cellule procaryote ou eucaryote, animale ou végétale. Selon un mode de  
15 réalisation préféré, l'invention concerne un procédé caractérisé en ce que ladite cellule est une cellule eucaryote, de préférence une cellule de mammifère, et de manière préférée une cellule humaine.

Enfin, l'invention concerne les cellules transfectées par le conjugué selon l'invention ; la cellule étant de préférence une cellule eucaryote,  
20 plus particulièrement de mammifère, et de manière préférée humaine.

D'autres caractéristiques et avantages de la présente invention seront mieux mis en évidence à la lecture des exemples suivants.

Dans ces exemples, on se référera aux figures suivantes :

25 **Figure N°1 :** Production d'interleukine 2 murine par des lignées RCC antfectées par le conjugué G250/BZQ/IL2 (G250=DNA) en présence ou non d'exotoxine A.

**Figure N°2 :** Production d'interleukine 2 murine par des lignées  
30 RCC antfectées par les conjugués G250-Biotinylé/avidine/BZQ/PL/IL2 (G250AvPL) et (G250+ExoT)-Biotinylé/avidine/BZQ/PL/IL2 (G250AvPLTox) ; contrôle négatif : avidine/BZQ/PL/IL2 (AvPL).

**Figure 3 :** Expression de la molécule CD4 à la surface de cellules de cancer de rein humain après antifection *in vitro* (% de cellules positives)

5

**Figure 4 :** Mesure de la sécrétion d'IL-2 de souris 11 jours après antifection de cellules de cancer de rein humain *in vitro*

**Figure 5 :** Induction de la mort de cellules de rein humain après antifection *in vitro* par l'ADNc de Bax humain.

10

**Figure 6 :** Mesure du volume de tumeurs obtenues aux jours J=7 et J=19 après la greffe tumorale après antifection *in vivo* de l'ADNc de Bax murin avec une injection (30 µg d'ADN) au jour J=7.

15

**Figure 7 :** Infiltration de tumeurs par des cellules CD16+ après antifection de l'ADNc de Bax murin

## 20 **EXEMPLES**

**EXEMPLE 1 : MATERIELS ET METHODES** (voir Dürrbach *et al.*, The antibody-mediated endocytosis of G250 tumor-associated antigen allows targeted gene transfer to human renal-cell-carcinoma *in vitro*, Cancer Gene Therapy, Sous Presse)

25

### **1.1. Cellules**

Les lignées cellulaires de carcinome rénal utilisées sont : IGR/RCC-17 (HIEG), IGR/RCC-40 (ROB), IGR/RCC-47 (FRAP), IGR/RCC-58 (MOJ) qui dérivent de trois tumeurs primaires (-17, -40 et -47) et d'une métastase surrénale (-58), de quatre patients atteints de RCC au stade métastatique. Selon les critères

30

histologiques, le RCC-17, -40 et -58 correspondent à des carcinomes à cellules claires et le RCC-47 à une forme particulière de carcinome à cellules claires avec des foci papillaires typiques hautement tumorigéniques chez la souris SCID (Angevin *et al.* 5 (1997) Proc. Am. Asso. Cancer Res. 38 : 238 ; Goulkhova *et al.* (1998) Genes Chrom. Cancer 22 :171-178). L'établissement de la culture *in vitro* ainsi que la caractérisation des lignées cellulaires de RCC ont été réalisées comme précédemment décrit (Angevin *et al.* (1997 Int. J. Cancer 72 :434-440). Les cellules sont cultivées à 10 37°C dans une atmosphère comportant 5% de CO<sub>2</sub> dans du milieu MEM modifié par Dulbecco avec du Glutamax-1 (Gibco BRL, Paisley, Scotland) supplémenté avec 10% de sérum de veau fœtal (Seromed, Berlin, Allemagne), 5% d'acides aminés non-essentiels, 10 mM de pyruvate de sodium (Gibco BRL) et un mélange de 15 pénicilline/streptomycine (10mg/ml) (Seromed).

### 1.2. Immunophénotypage de l'antigène G250

L'expression de l'antigène G250 associé aux tumeurs RCC a été directement testée par immunomarquage indirect en utilisant 20 l'anticorps monoclonal IgG1 G250 (mAb G250) de souris précédemment décrit (Oosterwijk *et al.*, 1986, Int. J. Cancer. 38:489-494). Une suspension de 5.10<sup>5</sup> cellules, obtenues par trypsination, a été lavée deux fois dans du milieu de culture des RCC ; les cellules sont ensuite incubées avec le mAb G250, lavées 25 3 fois dans du PBS (Phosphate-buffered saline), puis incubées avec un fragment F(ab')<sub>2</sub> d'anticorps IgG de chèvre anti-souris marqué au FITC. L'anticorps monoclonal NKTA ayant le même isotype (IgG1 dirigé contre un déterminant clonotypique du TCR $\alpha/\beta$ )(fourni gracieusement par le Docteur Thierry Hercend, 30 France) a été utilisé comme contrôle négatif. La cytométrie de flux a été réalisée avec un cytomètre FACScan (Becton-Dickinson, Sunnyvale, CA, USA) utilisant le logiciel Cellquest.

### 1.3. Expériences d'endocytose

L'anticorps G250 et l'apo-transferrine humaine chargée en fer (Sigma, St-Louis, MO, USA) ont été couplés respectivement avec de la fluorescéine isothiocyanate (Sigma) et avec du chlorure de sulfonyle Rhodamine B lissamine tel décrit précédemment (Maxfield *et al.*, 1978, Cell 14 :805-810 ; Brandzaeg, 1973, Scan. J. Immunol. 2 : 273-290). Les protéines conjuguées sont séparées des fluorochromes libres par gel filtration sur une colonne de Sephadex G50 (Pharmacia, Uppsala, Sweden). La liaison spécifique des protéines couplées avec les récepteurs cellulaires de surface a été déterminée par des expériences de compétition utilisant une concentration 100 fois supérieure de protéines non-couplées. L'ADN plasmidique BMGnéo-mIL2 contenant le cDNA de l'interleukine 2 de souris (IL-2) sous le contrôle du promoteur inductible du gène de la métallothionéine (Karasuyama et Melchers, 1988, Eur. J. Immunol. 18 : 97-104) (1 mg/ml) est incubé (vol/vol) avec EZ-link-Biotin-LC-ASA reconstitué dans l'éthanol (2 mg/ml) (Pierce, Rockford, IL, USA) et exposé pendant 15 min aux UV (365 nm) à 4°C. L'ADN plasmidique est ensuite précipité à l'éthanol (concentration finale 70%) pendant 30 min à -20°C. L'efficacité du marquage est déterminée par un test ELISA sur des microplaques couvertes de poly-L-lysine en utilisant de la phosphatase-alkaline conjuguée à de la streptavidine.

Pour tester l'endocytose, les cellules cultivées deux jours sur des lamelles sont lavées trois fois avec du RPMI-1640 (Gibco BRL) contenant 1 mg/ml de sérum albumine bovine (BSA), puis sont incubées deux fois 15 min dans du RPMI-1640 contenant 1 mg/ml de BSA à 37°C avec ou sans cytochalasine D (5  $\mu$ M) (Sigma). Les cellules sont ensuite incubées une heure à 4°C avec de la transferrine conjuguée à la rhodamine (50 nM) et de l'anticorps monoclonal G250 marqué au FITC dans du RPMI-1640 contenant 1 mg/ml de BSA avec ou sans cytochalasine D (5  $\mu$ M) puis transférées à 37°C pendant des temps variables avec de la

transferrine-Rhodamine seulement (pulse) ou avec le mAb G250 marqué au FITC. Les cellules sont lavées trois fois avec du PBS froid, fixées 20 min avec une solution de paraformaldéhyde 4%, glutaraldéhyde 0.025% dans du PBS à 4°C et préparées pour  
5 l'analyse en épifluorescence. Pour analyser la distribution du conjugué mAb G250-plasmide par double marquage, les cellules ont été incubées en permanence comme décrit ci-dessus soit avec du mAb G250 marqué au FITC conjugué avec de l'ADN plasmidique biotinylé ou soit avec un mélange de mAb G250  
10 marqué au FITC et de l'ADN plasmidique biotinylé, comme contrôle.

Après fixation, les cellules sont lavées deux fois dans du PBS, incubées 10 min avec 0,1% de borohydrate de sodium dans du PBS (ICN, Costa Mesa, CA, USA) et puis 10 min avec du  
15 chlorure d'ammonium (50 mM dans du PBS) (Sigma). Selon les conditions expérimentales, les cellules sont soit directement analysées par immunofluorescence pour détecter le mAb G250 marqué au FITC ou soit perméabilisées avec du PBS contenant 0,05% de saponine ou 0,1% de Triton X100 (ICN) puis marquées  
20 avec de la streptavidine conjuguée au Texas-red (20 mg/ml) (Pierce). Les filaments d'actine sont marqués avec de la phalloidine-rhodamine selon les recommandations du fabricant (Sigma).

Les cellules sont ensuite visualisées avec un microscope Axiophot  
25 (Zeiss, Oberkochen, Germany).

#### **1.4. Antifection et analyse de l'expression hétérologue**

Pour la transfection,  $3.10^5$  cellules de RCC fraîchement trypsinées sont incubées pendant 30 min à 4°C avec des concentrations  
30 différentes de conjugués mAb-ADN selon l'invention dans 1 ml de RPMI-1640 sans sérum. Les cellules sont ensuite incubées pendant 4 heures à 37°C dans 1 ml de RPMI-1640 sans-sérum contenant  $4.10^5$  M de chloroquine (Sigma) et finalement

resuspendues dans 2 ml de DMEM supplémenté avec du glutamax-1 (Gibco BRL) et 10% de sérum de veau fœtal. Dans des expériences séparées, les cellules de RCC sont incubées avec l'ADNc d'IL-2 de souris conjugué au mAb G250 en présence de  
5 cytochalasine D pendant 1 heure à 4°C et 4 heures à 37°C. Les conjugués toujours liés à la surface cellulaire ont été décrochés avec une solution de RPMI-1640 pH 7,2 contenant de la glycine 0,1M pendant 2 min à 4°C. Deux volumes de RPMI-1640 pH 9,0 sont ensuite ajoutés pendant 3 min et les cellules sont incubées  
10 dans un milieu de culture normal. Pour déterminer la production d'interleukine 2 murine, 100 µl de surnageants de culture de cellules ont été prélevés à des jours différents après la transfection. La production de cytokine dans le milieu a été déterminée en utilisant le kit ELISA DuoSet spécifique de l'IL-2 de  
15 souris (Réf. 80-3573-00) (seuil de détection de 15 pg/ml) (Genzyme Diagnostics, Cambridge, MA, USA)

**EXEMPLE 2 : Conjugués G250/BZQ/IL2 et**  
20 **G250/BZQ/IL2+ExoT**

**2.1. Préparation du conjugué G250/BZQ/IL2**

Le conjugué G250/BZQ/IL2 est préparé par couplage entre l'anticorps monoclonal G250 et un plasmide codant pour  
25 l'interleukine 2 murine (mIL-2) au moyen de la benzoquinone (BZQ) selon la méthode de couplage précédemment décrite par Poncet *et al.* (1996, Gene Therapy 3 : 731-738).

La BZQ dissoute dans de l'éthanol absolu à une concentration de 30 mg/ml est ajoutée à une solution d'anticorps monoclonal  
30 purifié en solution dans du PBS à une concentration d'au moins 2 mg/ml pour donner une solution finale contenant 3 mg/ml de BZQ. 1/10 du volume final est ensuite ajouté sous la forme de tampon de phosphate de potassium 1M pH 6.0. Après 90 min. à

température ambiante, dans l'obscurité, l'anticorps monoclonal activé est séparé de l'excès de BZQ par chromatographie sur une colonne G25M (Pharmacia) présaturée en 1% BSA dans du NaCl 0,15M, collecté puis mélangé avec l'ADN plasmidique purifié (10 fois la quantité d'anticorps). La solution est mélangée avec 0.1 M de tampon carbonate pH 8,7 et incubée 48 heures à 4°C. Le conjugué mAb-ADN est concentré par filtration sur gel sur une colonne FPLC Superose 6HR (Pharmacia) pour éliminer les excès d'anticorps libre susceptibles d'entrer en compétition avec le conjugué ADN-anticorps. Les fractions collectées sont dialysées contre du PBS et concentrées en utilisant une cartouche Centricon 10 (Amicon, MA, USA). Les quantités de conjugués solubles purifiés sont exprimées comme la quantité d'ADN plasmidique initialement utilisée dans la réaction.

15

## **2.2. Antifection de lignées RCC avec les conjugués G250/BZQ/Il2 et G250/BZQ/Il2+ExoT**

Nous avons comparé la mesure d'Il-2 après transfert de ce conjugué dans des lignées RCC après addition ou non d'exotoxine A (ExoT) de *Pseudomonas Aeruginosa* dans le milieu de culture. L'exotoxine A commercialisée par Sigma est ajoutée au conjugué G250/BZQ/Il2.

Les conjugués G250/BZQ/Il2 et G250/BZQ/Il2+ExoT sont mis en contact avec  $10^5$  cellules de lignées RCC en culture dans un milieu dépourvu en sérum pendant 4 heures à 37°C selon le protocole préalablement décrit. Les cellules sont remises en culture en milieu normal après lavages. La production d'Il-2 est mesurée 10 jours plus tard en utilisant le kit ELISA DuoSet (Réf. 80-3573-00, Genzyme Diagnostics).

Les cellules antifectées avec le conjugué G250/BZQ/Il2+ExoT produisent environ 3 fois plus d'Il-2 murine (371 pg/ $10^6$  cellules) que les cellules antifectées par le conjugué G250/BZQ/Il2 (165 pg/ $10^6$  cellules) (Figure N°1).

**EXEMPLE 3 : Conjugués G250-Biotinylé/avidine /BZQ/PL/Il2  
et (G250+ExoT)-Biotinylé/avidine/BZQ/PL/Il2**

5

**3.1. Préparation des conjugués**

Le corps central des conjugués G250-Biotinylé/avidine/BZQ/PL/Il2 et (G250+ExoT)-Biotinylé/avidine/BZQ/PL/Il2 se compose d'une molécule tétravalente d'avidine (Av) qui est dans un premier temps activée par la benzoquinone selon le protocole précédemment décrit. L'avidine activée lie les molécules de poly-L-lysine qui sont des molécules très affines pour l'ADN. Le complexe Avidine/BZQ/PL est mis en contact avec le plasmide codant l'interleukine 2 de souris (Il-2). Le complexe est ensuite associé à l'anticorps monoclonal G250 et/ou à l'exotoxine A (ExoT) tous deux préalablement biotinylés.

**3.2. Antifection de lignées RCC avec les conjugués G250-Biotinylé/ avidine/BZQ/PL/Il2 et (G250+ExoT)-Biotinylé/avidine/BZQ/PL/Il2**

Les différents complexes sont mis en contact avec  $10^5$  cellules de lignées RCC en culture dans un milieu dépourvu en sérum pendant 4 heures à 37°C selon le protocole préalablement décrit. Les cellules sont remises en culture en milieu normal après lavages. La production d'Il-2 est mesurée 10 jours plus tard en utilisant le kit ELISA DuoSet (Réf. 80-3573-00, Genzyme Diagnostics).

Les résultats sont présentés dans la figure N°2. Dans l'expérience contrôle dans laquelle l'anticorps monoclonal G250 a été omis, une certaine production de mIl-2 est mesurée ( $127 \text{ pg}/10^6$  cellules, AvPL) due certainement à l'accrochage non spécifique des



molécules de poly-L-lysine et/ou d'avidine à la surface des cellules. L'addition de mAb G250 au complexe avidine/BZQ/PL/Il2 augmente de 2 fois la production d'interleukine 2 murine (261 pg/10<sup>6</sup> cellules au lieu de 127 pg/10<sup>6</sup> cellules); la présence supplémentaire d'exotoxine A (ExoT) permet d'augmenter de 10 fois la production de mIl-2 (1347 pg/10<sup>6</sup> cellules) (Figure N°2).

**EXEMPLE 4 : Conjugué G250-biotinylé/neutravidine/histone H1 biotinylé/peptide fusiogène de l'hémagglutinine d'*Influenzae* (HA) biotinylé/CD4**

Les différents complexes tels que mentionnés sur les figures sont mis en contact avec des RCC, comme décrit dans l'exemple 3, section 3.2.

15

La figure 3 représente l'analyse en cytométrie en flux des cellules RCC humaines portant l'Ag G250, collectées 7 jours après antifection de l'ADNc codant pour la molécule de CD4 humain et marquées par un AcM anti-CD4 humain. Environ 20% des cellules expriment de la sorte cette molécule. Le vecteur utilisé comprenait la totalité des molécules, G250,H1,HA,ADNc. La séquence du peptide HA utilisé est la suivante : GLFEAIAGFIENGWEGMIDGGGCGSGSYTDIEMNRLGKG.

**EXEMPLE 5 : Conjugué G250-biotinylé/neutravidine/histone H1 biotinylé/Il2 et Conjugué G250 biotinylé/neutravidine/histone H1 biotinylé/peptide fusogène HA biotinylé/Il2**

La figure 4 représente le résultat d'une antifection de cellules RCC humaines portant l'Ag G250, collectées 11 jours après antifection de l'ADNc codant pour l'interleukine-2 de souris. La quantité d'IL-2 sécrétée par les RCC mises en contact avec l'ADNc seul ou couplé à la neutravidine est de 80 pg/10<sup>6</sup> cellules, 1200 pg/10<sup>6</sup> cellules pour les

RCC mises en contact avec un conjugué comprenant G250/H1/ADNc et 3100 pg/10<sup>6</sup> cellules pour les RCC mises en contact avec un conjugué comprenant G250/H1/HA/ADNc.

5 **EXEMPLE 6 : G250 biotinylé/neutravidine/histone H1 biotinylé/BAX et G250 biotinylé/neutravidine/histone H1 biotinylé/peptide fusogène HA biotinylé/BAX**

La figure 5 représente le résultat d'une antifection de cellules RCC  
10 humaines portant l'Ag G250, collectées 11 jours après antifection de l'ADNc codant pour la molécule pro-apoptotique Bax humaine. La mort cellulaire a été appréciée par coloration au bleu de Trypan. L'ADNc contrôle utilisé correspond au gène de la *green fluorescent protein* (GFP). On peut noter une augmentation importante de la perte de  
15 viabilité liée à l'accrochage de l'AcM G250 « Vecteur BAX sans HA », accrue par l'accrochage du peptide fusiogène de HA « Vecteur BAX avec HA ».

**EXEMPLE 7 : Antifection *in vivo* avec le conjugué 5C5  
20 biotinylé/neutravidine/histone H1 biotinylé/peptide fusogène HA biotinylé/BAX murin**

**7.1. Protocole**

Différents conjugués sont préparés à partir de :

- 25 - 10 µg d'anticorps 5C5  
- 30 µg d'ADN BAX murin  
- 15 µg d'histone H1  
- 0.5 µg de peptide HA  
- 4 µg de neutravidine.

30 Neuf souris nude irradiées servant de contrôle, ont reçu une greffe de tumeur RCC en sous-cutanée au jour J = 0. Ces souris greffées n'ont pas de conjugué.

Dix souris nude irradiées ont reçu une greffe de tumeur RCC en sous-cutanée au jour J = 0 puis au jour J = 7, elles ont reçu par voie intraveineuse le conjugué neutravidine-/HA/h1/Bax en une seule injection.

- 5 Dix souris nude irradiées ont reçu une greffe de tumeur RCC en sous-cutanée au jour J = 0 puis au jour J = 7, elles ont reçu par voie intraveineuse le conjugué 5C5/neutravidine/HA/H1/Bax en une seule injection.

La taille des tumeurs a ensuite été évaluée au jour J5, J8, J12 et

- 10 J19 après l'injection les souris ont été sacrifiées au jour J19.

## **7.2. Résultats**

- Une diminution de la croissance tumorale inférieure à celle notée dans les groupes contrôles est observée chez 6 souris sur 10 recevant le  
15 complexe entier et 1 sur 10 dans le groupe traité avec le complexe sans anticorps, et ce à jour 19 après la première injection (figure N°6).

- De façon intéressante, le marquage retrouvée dans les tumeurs  
antifectées avec Bax, à l'aide d'un AcM fluorescent dirigé contre la  
20 molécule CD16 de souris présente sur des cellules de type natural killer (cellules NK), macrophages, granulocytes indique clairement la possibilité de recruter des cellules effectrices pouvant participer pleinement à la réponse anti-tumorale (figure N°7).

### REFERENCES

- 5 Angevin *et al.* 1997, Proc. Am. Asso. Cancer Res. 38 : 238.  
Angevin *et al.* 1997, Int. J. Cancer 72 :434.  
Brandzaeg 1973, Scan. J. Immunol. 2 : 273.  
Chittenden *et al.* 1995, Nature 374 : 733  
Cournoyer *et al.* 1991, Human Gene Therapy, 2 : 203.
- 10 Dürnbach *et al.* (Sous Presse) Cancer Gene Therapy.  
Dubes et Wegrzyn 1978, Protoplasma 96 : 209-223.  
Fominaya et Wels 1995, J. Biol. Chem. 271 :10560.  
Golumbek *et al.* 1991, Science 254 :713.  
Goulkhova *et al.* 1998, Genes Chrom. Cancer 22 :171.
- 15 Hirsch *et al.* 1993, Transpl. Proc. 25 : 138.  
Karasuyama et Melchers 1988, Eur. J. Immunol. 18 : 97.  
Kasahara *et al.* 1987, J. Biol. Chem. 262 :4429.  
Kiefer *et al.* 1995, Nature 374 : 736  
Luthman *et al.* 1983, Nucleic Acids Res. 11 : 1295.
- 20 Maxfield *et al.* 1978, Cell 14 :805.  
Michael et Curiel 1994, Gene Therapy 1:223.  
Neda *et al.* 1991, J. Biol. Chem. 266 : 14143.  
Old 1985, Science 230 : 630  
Oltvai *et al.* 1993, Cell 74 :609
- 25 Oosterwijk *et al.* 1986, Int. J. Cancer. 38 :489.  
Poncet *et al.* 1996, Gene Therapy 3 : 731.  
Ragot *et al.* 1993, Nature 361 : 647.  
Rosenberg *et al.* 1990, N. Eng. J. Med. 323 :570.  
Roux *et al.* 1989, Proc.Natl.Acad.Sci. USA 86 :9079.
- 30 Susin *et al.* 1999, Nature 397 : 441.  
Takahashi *et al.* 1994, Int. Immun. 6 :1567  
Wang *et al.* 1996, Genes Dev. 10 : 2859  
Wienhues *et al.* 1987, DNA 6(1) : 81-89.

Wu *et al.* 1991, J. Biol. Chem. 266 :14338.

Zenke *et al.* 1990, Proc.Natl.Acad.Sci. USA, 87 :3655.

## REVENDICATIONS

- 5 1. Conjugué pour le transfert d'une molécule d'acide nucléique dans  
une cellule caractérisé en ce qu'il comprend une molécule d'acide  
nucléique, un domaine de translocation et un anticorps spécifique  
d'un antigène de surface de ladite cellule, tel que ladite molécule  
d'acide nucléique, ledit domaine de translocation et ledit anticorps  
10 sont conjugués au moyen d'au moins un agent de pontage, et tel  
que ledit conjugué est transfecté efficacement dans ladite cellule.
2. Conjugué selon la revendication 1 caractérisé en ce qu'il comprend  
en outre un peptide clivable par au moins une enzyme glycolytique  
15 et/ou protéolytique, ledit anticorps étant lié audit domaine de  
translocation via ledit peptide clivable.
3. Conjugué selon la revendication 2 caractérisé en ce que ledit  
anticorps et ledit peptide clivable sont liés de manière covalente via  
20 un agent de pontage sélectionné de préférence dans le groupe  
composé de la benzoquinone, de l'EDC, de l'APDP.
4. Conjugué selon la revendication 2 caractérisé en ce que ledit  
anticorps et ledit peptide clivable sont liés à une molécule de type  
25 avidine au moyen d'un agent de pontage qui peut être identique ou  
différent et qui est sélectionné de préférence dans le groupe  
composé de la biotine, la benzoquinone, de l'EDC, de l'APDP.
5. Conjugué selon la revendication 3 ou 4 caractérisé en ce que ledit  
30 domaine de translocation est lié audit peptide clivable par une  
liaison chimique covalente.

6. Conjugué selon la revendication 5 caractérisé en ce que ledit domaine de translocation est lié à une molécule d'acide nucléique au moyen d'un agent de pontage.
- 5 7. Conjugué selon la revendication 6 caractérisé en ce que ledit agent de pontage est l'APDP.
8. Conjugué selon l'une quelconque des revendications 6 et 7 caractérisé en ce que ledit anticorps est lié audit peptide clivable  
10 par une liaison covalente au moyen dudit agent de pontage EDC, ledit peptide clivable étant lié audit domaine de translocation par une liaison covalente au moyen d'une liaison chimique, ledit domaine de translocation étant lié audit acide nucléique par une liaison covalente au moyen dudit agent de pontage APDP.  
15
9. Conjugué selon la revendication 5 caractérisé en ce que la liaison entre ledit domaine de translocation et ladite molécule d'acide nucléique est réalisée au moyen d'une molécule de liaison aux acides nucléiques, ladite molécules de liaison aux acides nucléiques  
20 étant liée audit domaine de translocation par une liaison covalente au moyen d'un agent de pontage.
10. Conjugué selon la revendication 9 caractérisé en ce que ledit agent de pontage est l'APDP.  
25
11. Conjugué selon l'une quelconque des revendications 9 et 10 caractérisé en ce que ledit anticorps est lié audit peptide clivable par une liaison covalente au moyen dudit agent de pontage EDC, ledit peptide clivable étant lié audit domaine de translocation par  
30 une liaison covalente au moyen d'une liaison chimique, ledit domaine de translocation étant lié à ladite molécule de liaison aux acides nucléiques par une liaison covalente au moyen dudit agent

de pontage APDP, ladite molécule de liaison aux acides nucléiques liant ledit acide nucléique par une liaison non-covalente.

12. Conjugué selon la revendication 1 caractérisé en ce qu'il  
5 comprend en outre une molécule de liaison aux acides nucléiques, tel que ledit domaine de translocation, ledit anticorps et ladite molécule de liaison aux acides nucléiques sont liés à une molécule de type avidine au moyen d'un agent de pontage qui peut être identique ou différent, ladite molécule de liaison aux acides  
10 nucléiques liant ladite molécule d'acide nucléique.

13. Conjugué selon la revendication 1 caractérisé en ce qu'il comprend en outre une molécule de liaison aux acides nucléiques et un peptide clivable par au moins une enzyme glycolytique et/ou  
15 protéolytique, tel que ledit domaine de translocation, ledit anticorps et ledit peptide clivable sont liés à une molécule de type avidine au moyen d'un agent de pontage qui peut être identique ou différent, ladite molécule de liaison aux acides nucléiques étant liée à ladite molécule d'acide nucléique, ladite molécule de liaison aux acides  
20 nucléiques étant liée audit peptide clivable et à ladite molécule d'acide nucléique.

14. Conjugué pour le transfert d'une molécule d'acide nucléique dans une cellule caractérisé en ce qu'il comprend une molécule  
25 d'acide nucléique, un anticorps spécifique d'un antigène de surface de cellule et une molécule de liaison aux acides nucléiques tel que ledit conjugué est transfecté efficacement dans ladite cellule.

15. Conjugué selon la revendication 14 caractérisé en ce qu'il  
30 comprend en outre un peptide clivable par au moins une enzyme glycolytique et/ou protéolytique, ledit anticorps étant lié à ladite molécule de liaison aux acides nucléiques via ledit peptide clivable.



16. Conjugué selon la revendication 15 caractérisé en ce que ledit anticorps et ledit peptide clivable sont liés de manière covalente via un agent de pontage sélectionné de préférence dans le groupe composé de la benzoquinone, de l'EDC, de l'APDP.
- 5
17. Conjugué selon la revendication 15 caractérisé en ce que ledit anticorps et ledit peptide clivable sont liés à une molécule de type avidine au moyen d'un agent de pontage qui peut être identique ou différent sélectionné de préférence dans le groupe composé de la
- 10 biotine, la benzoquinone, de l'EDC, de l'APDP.
18. Conjugué selon la revendication 16 ou 17 caractérisé en ce que ledit peptide clivable est lié à ladite molécule de liaison aux acides nucléiques au moyen d'un agent de pontage, ladite molécule de
- 15 liaison aux acides nucléiques liant ledit acide nucléique par une liaison non-covalente.
19. Conjugué selon la revendication 18 caractérisé en ce que ledit agent de pontage est l'APDP.
- 20
20. Conjugué pour le transfert d'une molécule d'acide nucléique dans une cellule caractérisé en ce qu'il comprend une molécule d'acide nucléique, un anticorps spécifique d'un antigène de surface de cellule et un peptide clivable par au moins une enzyme
- 25 glycolytique et/ou protéolytique tel que ledit conjugué est transfecté efficacement dans ladite cellule.
21. Conjugué selon la revendication 20 caractérisé en ce que ledit anticorps et ledit peptide clivable sont liés de manière covalente via
- 30 un agent de pontage sélectionné de préférence dans le groupe composé de la benzoquinone, de l'EDC, de l'APDP.

22. Conjugué selon la revendication 20 caractérisé en ce que ledit anticorps et ledit peptide clivable sont liés à une molécule de type avidine au moyen d'un agent de pontage qui peut être identique ou différent sélectionné de préférence dans le groupe composé de la biotine, la benzoquinone, de l'EDC, de l'APDP.
23. Conjugué selon la revendication 21 ou 22 caractérisé en ce que ledit peptide clivable est lié audit acide nucléique par une liaison covalente au moyen d'un agent de pontage.
24. Conjugué selon la revendication 21 ou 22 caractérisé en ce que la liaison entre ledit peptide clivable et ladite molécule d'acide nucléique est réalisée au moyen d'une molécule de liaison aux acides nucléiques, ladite molécule de liaison aux acides nucléiques étant liée audit peptide clivable par une liaison covalente au moyen d'un agent de pontage.
25. Conjugué selon les revendications 23 et 24 caractérisé en ce que ledit agent de pontage est l'APDP.
26. Conjugué selon l'une quelconque des revendications 20 à 25 caractérisée en ce que ledit conjugué comprend en outre un domaine de translocation.
27. Conjugué selon la revendication 26 caractérisé en ce que ledit domaine de translocation est lié de manière covalente au moyen d'un agent de pontage à ladite molécule d'acide nucléique et/ou à ladite molécule de liaison aux acides nucléiques .
28. Conjugué selon l'une quelconque des revendications 1, 6, 8, 13, 14, 17 et 22 caractérisé en ce que ledit agent de pontage est sélectionné dans le groupe composé de la benzoquinone, de la

biotine, des carbodiimides, des agents pontants présentant au moins un groupement phénylazide réagissant aux ultra-violets (UV).

29. Conjugué selon la revendication 1 caractérisé en ce que ledit  
5 agent de pontage est sélectionné dans le groupe composé de la benzoquinone, de la biotine, de l'EDC, l'APDP.
30. Conjugué selon la revendication 12 caractérisé en ce que l'agent  
de pontage qui lie ledit domaine de translocation et ledit anticorps à  
10 la molécule de type avidine est la biotine et, l'agent de pontage qui lie ladite molécule de liaison aux acides nucléiques à la molécule de type avidine est la benzoquinone.
31. Conjugué selon la revendication 13 caractérisé en ce que l'agent  
15 de pontage qui lie ledit domaine de translocation et ledit anticorps à la molécule de type avidine est la biotine et, l'agent de pontage qui lie ledit peptide clivable à la molécule de type avidine est la benzoquinone.
- 20 32. Conjugué selon la revendication 12 caractérisé en ce que l'agent de pontage qui lie ledit domaine de translocation, ledit anticorps et ladite molécule de liaison aux acides nucléiques est la biotine.
33. Conjugué selon la revendication 13 caractérisé en ce que l'agent  
25 de pontage qui lie ledit domaine de translocation, ledit anticorps et ledit peptide clivable est la biotine.
34. Conjugué selon la revendication 17 caractérisé en ce que l'agent  
de pontage qui lie ledit anticorps à la molécule de type avidine est la  
30 biotine, et l'agent de pontage qui lie ladite molécule de liaison aux acides nucléiques à la molécule de type avidine est la benzoquinone.

35. Conjugué selon la revendication 17 caractérisé en ce que ledit agent de pontage est la biotine.
36. Conjugué selon l'une quelconque des revendications 1 à 35  
5 caractérisé en ce que ladite molécule d'acide nucléique est choisie parmi l'ADN simple brin, l'ADN double brin, l'ARN simple brin, l'ARN double brin, l'hybride ARN/ADN.
37. Conjugué selon la revendication 36 caractérisé en ce que ladite  
10 molécule d'acide nucléique est de l'ADN double brin ou de l'ARN simple brin qui code pour un produit protéique d'intérêt qui s'exprime efficacement dans ladite cellule.
38. Conjugué selon la revendication 35 caractérisé en ce que ledit  
15 produit protéique d'intérêt est choisi dans un groupe composé des cytokines, des lymphokines, des chémokines, des facteurs de croissance, des gènes tueurs, des gènes qui permettent de lever la chimiorésistance, des enzymes de restriction.
- 20 39. Conjugué selon la revendication 38 caractérisé en ce que le produit protéique d'intérêt est la protéine Bax.
40. Conjugué selon la revendication 36 caractérisée en ce que ladite  
25 molécule d'acide nucléique est un ARN antisens.
41. Conjugué selon l'une quelconque des revendications 8 à 10, 12 à  
19, 24, 30, 32, 34 caractérisé en ce que la molécule de liaison aux acides nucléiques lie ladite molécule d'acide nucléique par une  
liaison non-covalente.
- 30 42. Conjugué selon l'une quelconque des revendications 8 à 10, 12 à 19, 24, 30, 32, 34, 41 caractérisé en ce que la molécule de liaison

aux acides nucléiques est un polymère polycationique ou une protéine de liaison aux acides nucléiques.

43. Conjugué selon la revendication 42 caractérisé en ce que ledit polymère polycationique est choisi parmi la poly-L-lysine, la poly-D-lysine, le polyéthylènimine, la polyamidoamine, la polyamine, et les polycations libres.

44. Conjugué selon la revendication 43 caractérisé en ce que ledit polymère polycationique est la poly-L-lysine.

45. Conjugué selon la revendication 42 caractérisé en ce que ladite protéine de liaison aux acides nucléiques est choisie parmi les histones, la protamine, l'ornithine, la putrescine, la spermidine, la spermine, les facteurs de transcription, les protéines homéobox.

46. Conjugué selon la revendication 45 caractérisé en ce que ladite protéine de liaison aux acides nucléiques est sélectionnée dans le groupe composé de la protamine et des histones.

47. Conjugué selon l'une quelconque des revendications 1 à 13 et 26, 27, 30 à 33 caractérisé en ce que ledit domaine de translocation dérive d'une toxine virale sans contenir la partie de la toxine qui lui confère son effet toxique.

48. Conjugué selon la revendication 47 caractérisé en ce que ledit domaine de translocation est un fragment de l'hémagglutinine d'*Haemophilus A*.

49. Conjugué selon l'une quelconque des revendications 1 à 48 caractérisé en ce que ledit anticorps est un anticorps monoclonal ou un anticorps polyclonal.

50. Conjugué selon la revendication 49 caractérisé en ce que ledit anticorps est spécifique d'un antigène de surface membranaire.
51. Conjugué selon la revendication 50 caractérisé en ce que ledit  
5 antigène est l'antigène G250.
52. Conjugué selon la revendication 50 caractérisé en ce que ledit anticorps est l'anticorps monoclonal 5C5 obtenu par l'hybridome 5C5 déposé à la CNCM sous le N° I-2184.
- 10 53. Conjugué selon l'une quelconque des revendications 1 à 52 à titre de médicament.
54. Conjugué selon l'une quelconque des revendications 1 à 52 à  
15 titre de médicament pour la thérapie génique.
55. Conjugué selon les revendications 53 et 54 à titre de médicament pour le traitement des maladies génétiques acquises ou constitutionnelles.
- 20 56. Conjugué selon la revendication 55 à titre de médicament pour le traitement des maladies génétiques acquises choisies parmi les cancers et les maladies infectieuses.
- 25 57. Conjugué selon la revendication 56 à titre de médicament pour le traitement du carcinome des cellules rénales (RCC).
- 30 58. Conjugué selon l'une quelconque des revendications 1 à 52 à titre de médicament destiné au transfert d'une molécule d'acide nucléique dans une cellule caractérisé en ce que ladite cellule est mise en contact avec ledit conjugué de façon à transfecter ladite cellule avec ledit conjugué.

59. Conjugué selon la revendication 58 caractérisé en ce que ladite molécule d'acide nucléique code pour un produit protéique d'intérêt qui s'exprime efficacement dans ladite cellule transfectée.
- 5 60. Conjugué selon la revendication 58 caractérisé en ce que ladite molécule d'acide nucléique se maintient sous la forme d'un réplicon extrachromosomique dans ladite cellule.
61. Conjugué selon la revendication 58 caractérisé en ce que ladite  
10 molécule d'acide nucléique s'intègre dans l'ADN génomique et/ou mitochondrial de ladite cellule transfectée.
62. Conjugué selon les revendications 58 à 61 caractérisé en ce que  
15 ladite cellule est une cellule eucaryote.
63. Composition pharmaceutique notamment pour le traitement des  
maladies par thérapie génique qui comprend une quantité  
thérapeutiquement efficace d'un conjugué selon l'une quelconque  
des revendications 1 à 52 et un véhicule pharmaceutiquement  
20 acceptable.

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



## Production de mIL2 après antifection

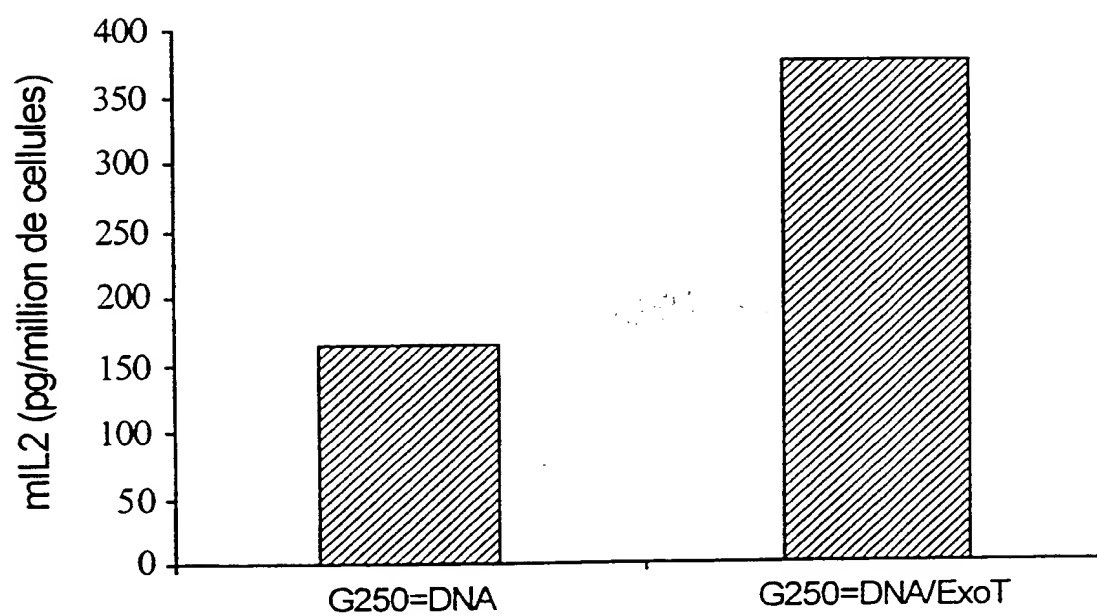


FIG. 1

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

2 / 7

Production de mIL2 après antifection

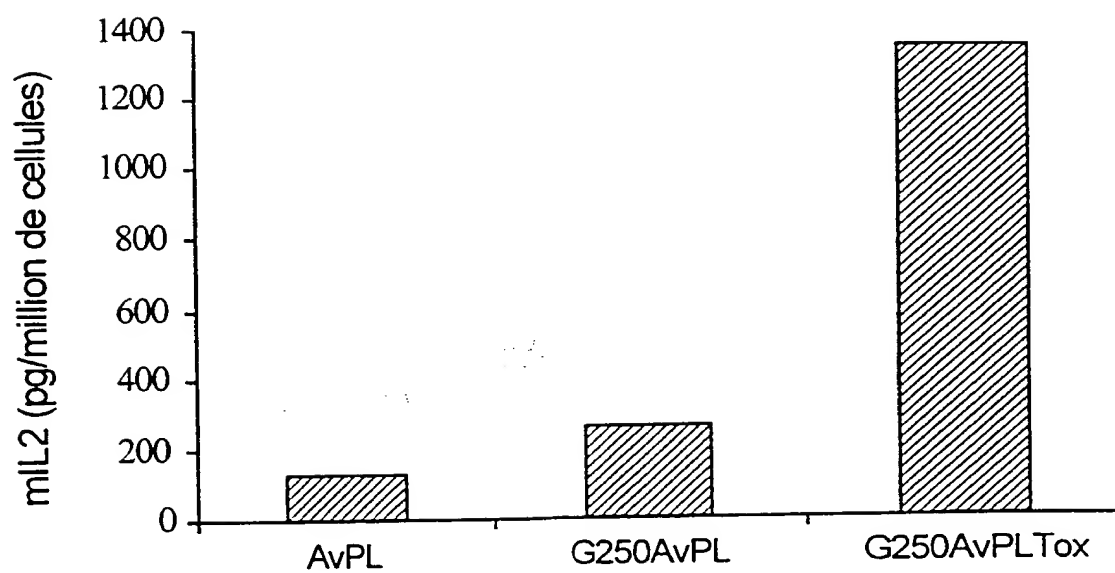


FIG. 2

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

3 / 7

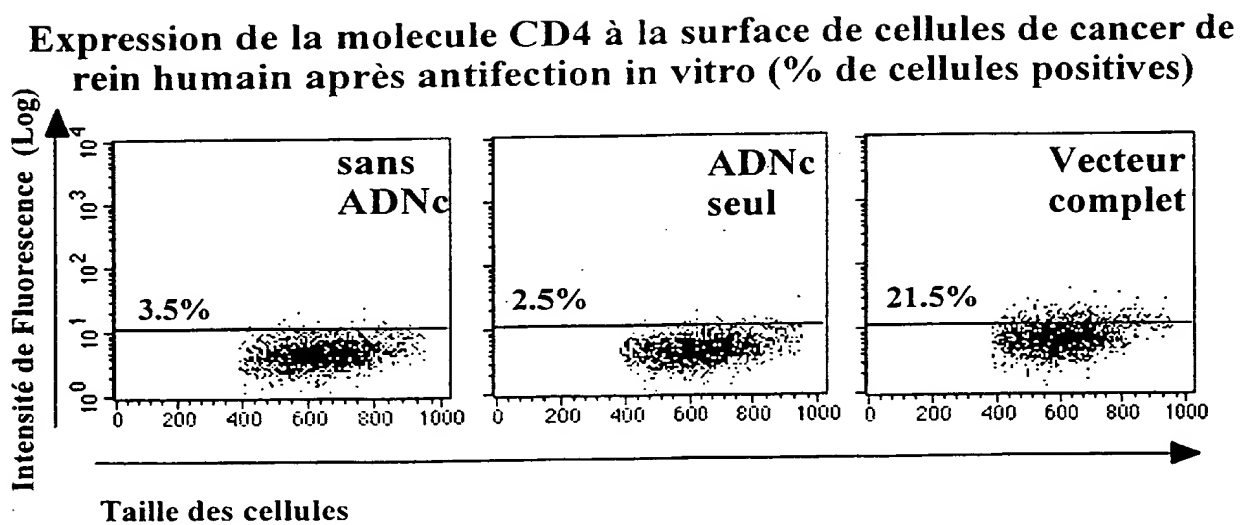


FIG. 3

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

4 / 7

Mesure de la sécrétion d'IL-2 de souris 11 jours après antifection de cellules de cancer de rein humain in vitro

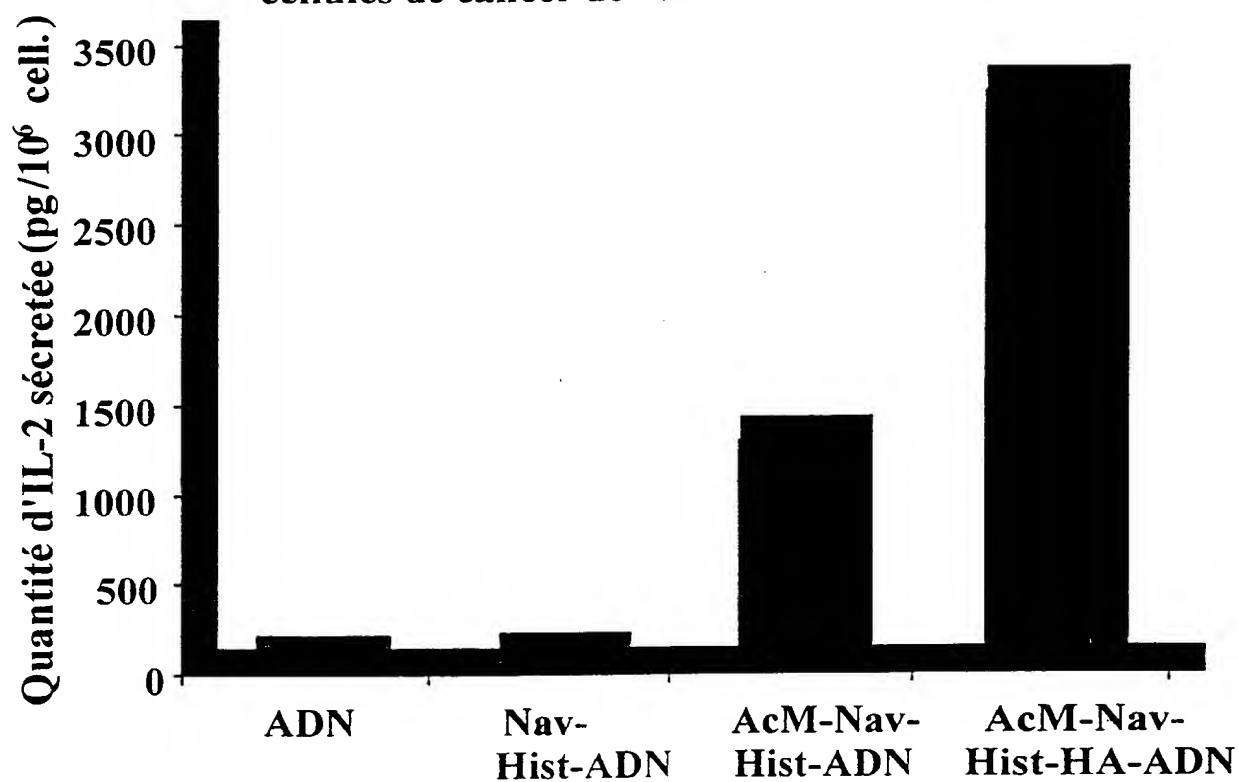


FIG. 4

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



5 / 7

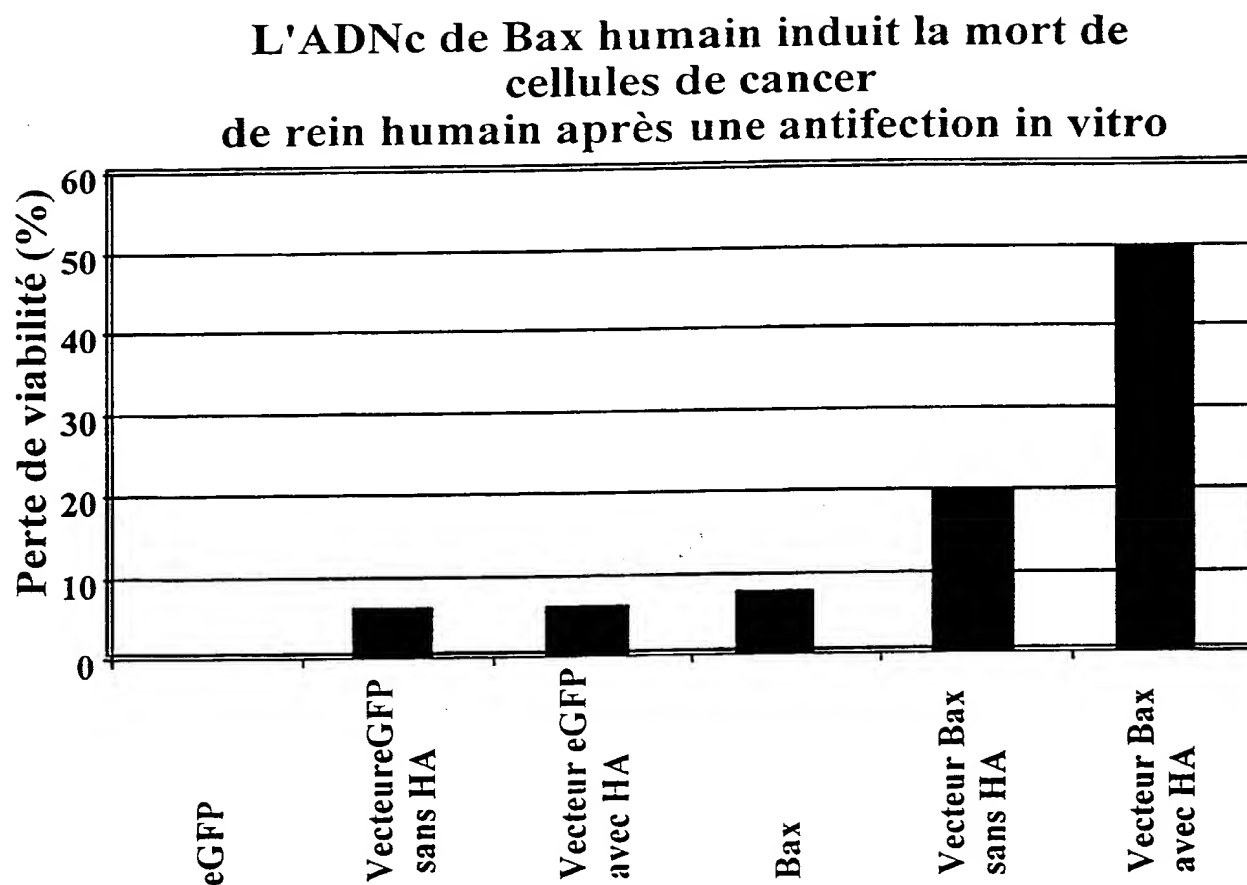


FIG. 5

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

6/7

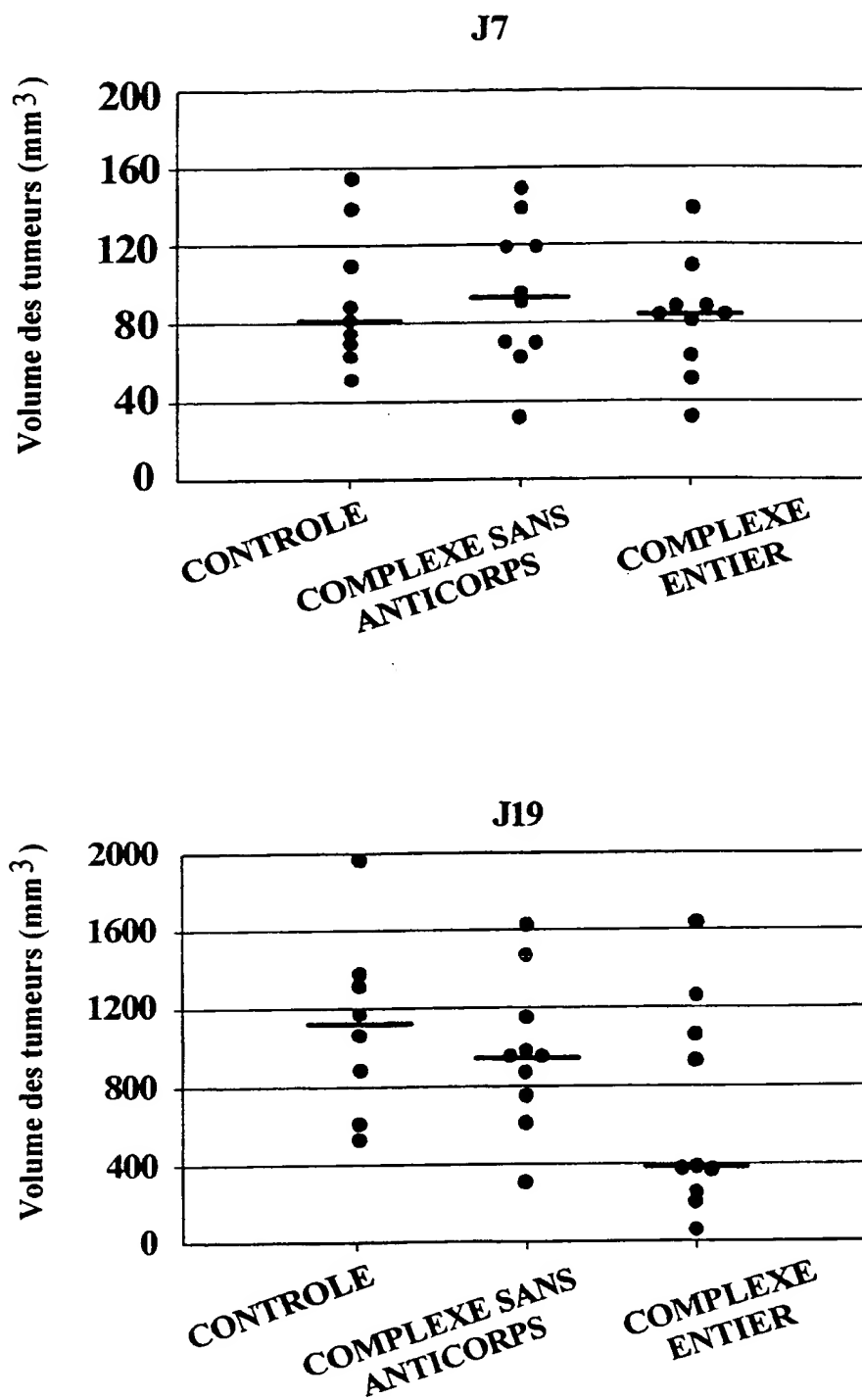


FIG. 6

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

7 / 7

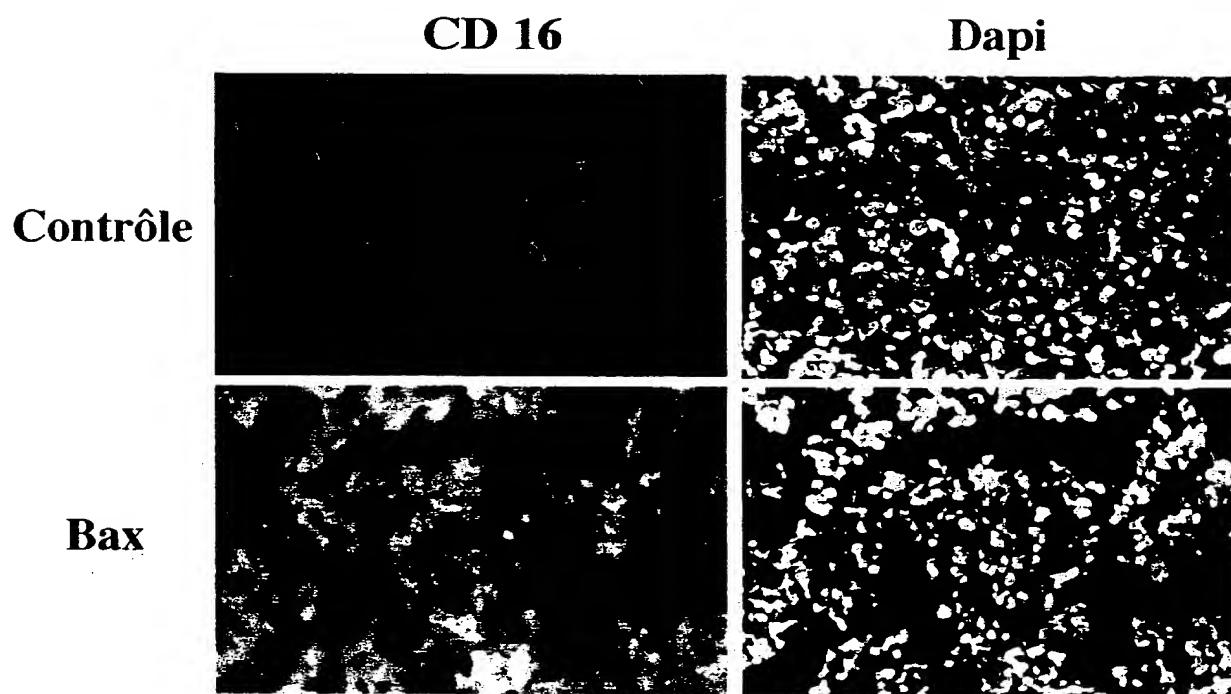


FIG. 7

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

RAPPORT DE RECHERCHE  
PRELIMINAIREN° d'enregistrement  
national

99 05943

FA 573407

INSTITUT NATIONAL  
de la  
PROPRIETE INDUSTRIELLEétabli sur la base des dernières revendications  
déposées avant le commencement de la recherche

## Documents considérés comme pertinents

Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	Revendications concernées de la demande examinée	Domaines techniques recherchés (INT CL <sup>8</sup> )
D,X  Y	WO 96 13599 A (WELS WINFRIED ; FOMINAYA JESUS (CH)) * page 2, alinéa 1 – page 6, alinéa 1 * * page 7, alinéa 2 * * page 10, alinéas 1,2 * * page 20, alinéa 1,2 * * page 20, alinéa 4 – page 21, alinéa 1 *	1,4,13-16, 18-20,23, 25-31,34-37, 39-43, 2,3, 5-12,17,32, 33,38	A 61K
D,X  Y	FOMINAYA J ET AL : « Target cell-specific DNA transfer Mediated by a chimeric multidomain protein. Novel non-viral gene delivery system »; JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, (1996 MAY 3) 271 (18) 10560-8, XP002133110 * page 10560 * * abrégé * * page 10562 ; figure 1 *	1,4,13,14,19, 20,23,25-27, 30,31,34-37 39-43,  2,3 5-12,32,33,38	
X  Y	CHAKRABARTI, M. ET AL : « Transfer of DNA into lymphoma cells by DNA-bound to T101-biotinylated-avidin-polylysine antibody complex. » JOURNAL OF NUCLEAR MEDICINE, (1996) VOL. 37, NO.5 SUPPL., PP. 62P. MEETING INFO. : 43 <sup>RD</sup> ANNUAL MEETING OF THE SOCIETY OF NUCLEAR MEDICINE DENVER, COLORADO, USA JUNE 3-5, 1996, XP002133111 Abstract no. 237	4-6,12-14 19-22,30,31, 34-37,39-43   11,23,24,32, 33,38	

Date : 15 mars 2000

Examineur : Sitch, W

## CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES

X : particulièrement pertinent à lui seul  
Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie  
pertinent à l'encontre d'au moins une revendication ou  
arrière-plan technologique général  
divulgation non-écrite  
document intercalaire

T : théorie ou principe à la base de l'invention  
E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date ou qu'à une date postérieure  
D : cité dans la demande  
L : cité pour d'autres raisons  
  
& : membre de la même famille, document correspondant

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



**RAPPORT DE RECHERCHE  
PRELIMINAIRE**

établi sur la base des dernières revendications  
déposées avant le commencement de la recherche

N° d'enregistrement  
national

99 05943

FA 573407

**Documents considérés comme pertinents**

Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	Revendications concernées de la demande examinée	Domaines techniques recherchés (INT CL <sup>6</sup> )
X	DATABASE MEDLINE 'Online ! US NATIONALE LUBRARY OF MEDICINE (NLM), BETHESDA, MD, US GUY J ET AL : « Delivery of DNA into mammalian cells by Receptor-mediated endocytosis and gene therapy ». Retrieved from STN Database accession no. 96031841 XP002133112	1,4,13,14 19-22,30,31 34-37,39-43	A 61K
Y	* Abrégé *	23,24,32,33 38	
Y	& MOLECULAR BIOTECHNOLOGY WO 9521195 A (DONATO NICHOLAS J ; ROSENBLUM MICHAEL G (US) ; RES DEV FOUNDATION (U) 10 août 1995 (195-08-10) * page 3, ligne 26 – page 6, ligne 11 *	2,3,5,6,8,9 11,12	
D,Y	PONCET ET AL : « ANTIFECTION : AN ANTIBODY- MEDIATED METHOD TO INTRODUCE GENES INTO LYMPHOID CELLS IN VITRO AND IN VIVO » GENE THERAPY, Vol. 3, 1996, pages 731-738, XP000877306 * page 736 * * page 5 *	7,8,11	
D,Y	US 5 428 132 A (HIRSCH FRANCOIS ET AL) 27 juin 1995 (1995-06-27) * colonne 2 – colonne 4 ; exemple 1 *	7,8,11	
Y		17	

Date : 15 mars 2000

Examineur : Sitch, W

**CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES**

X : particulièrement pertinent à lui seul  
Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre  
document de la même catégorie  
A : pertinent à l'encontre d'au moins une revendication ou  
arrière-plan technologique général  
O : divulgation non-écrite  
P : document intercalaire

T : théorie ou principe à la base de l'invention  
E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la  
date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date ou qu'à  
une date postérieure  
D : cité dans la demande  
L : cité pour d'autres raisons  
& : membre de la même famille, document correspondant

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

# RAPPORT DE RECHERCHE PRELIMINAIRE

N° d'enregistrement  
national  
**99 05943**  
**FA 573407**

INSTITUT NATIONAL  
de la  
PROPRIETE INDUSTRIELLE

établi sur la base des dernières revendications  
déposées avant le commencement de la recherche

## Documents considérés comme pertinents

Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	Revendications concernées de la demande examinée	Domaines techniques recherchés (INT CL <sup>6</sup> )
Y	WO 98 02564 A (JOHN P ROBARTS RESEARCH INST ; STRATHDEE CRAIG A (CA)) 22 janvier 1998 (1998-01-22) * revendications 1,16,32,33,,37,38 *	17	A 61K
Y	US 5 166 320 A (WU GEORGE Y ET AL) 24 novembre 1992 (1992-11-24) * page 3, ligne 25 – page 4, ligne 51 *	23,24	
D,Y	WO 88 08854 A (OOSTERWIJK EGBERT ; WARNAAR SVEN O (NL)) 17 novembre 1988 (1988-11-17) * page 2, alinéa 1 – page 3, alinéa 4 *	32,33,38	
D,A	WO 94 04696 A (MILES INC) 3 mars 1994 (1994-03-03) * page 4, ligne 24 – page 8, ligne 18 * * figures 4-6		
Date : 15 mars 2000		Examineur : Sitch, W	
<b>CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES</b> X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : pertinent à l'encontre d'au moins une revendication ou arrière-plan technologique général O : divulgation non-écrite P : document intercalaire		T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date ou qu'à une date postérieure D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons  & : membre de la même famille, document correspondant	

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

**ANNEXE AU RAPPORT DE RECHERCHE PRÉLIMINAIRE  
RELATIF A LA DEMANDE DE BREVET FRANÇAIS NO.**

FA 573407  
FR 9905943

La présente annexe indique les membres de la famille de brevets relatifs aux documents brevets cités dans le rapport de recherche préliminaire visé ci-dessus.  
Les dits membres sont contenus au fichier informatique de l'Office européen des brevets à la date du  
Les renseignements fournis sont donnés à titre indicatif et n'engagent pas la responsabilité de l'Office européen des brevets,  
ni de l'Administration française

15-03-2000

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 9613599 A	09-05-1996	AU 695196 B AU 3926895 A EP 0789776 A JP 9511916 T NZ 295673 A	06-08-1998 23-05-1996 20-08-1997 02-12-1997 29-03-1999
WO 9521195 A	10-08-1995	AU 695564 B AU 1868795 A CN 1143374 A EP 0743958 A FI 963103 A JP 9508792 T NO 963283 A	13-08-1998 21-08-1995 19-02-1997 27-11-1996 01-10-1996 09-09-1997 06-08-1996
US 5428132 A	27-06-1995	AUCUN	
WO 9802564 A	22-01-1998	AU 3332097 A	09-02-1998
US 5166320 A	24-11-1992	US 5635383 A US 5874297 A JP 2731844 B JP 63269985 A	03-06-1997 23-02-1999 25-03-1998 08-11-1988
WO 8808854 A	17-11-1988	EP 0366707 A	09-05-1990
WO 9404696 A	03-03-1994	AU 674026 B AU 5088593 A CA 2143308 A EP 0658210 A FI 950866 A JP 8504565 T NO 950726 A NZ 255870 A ZA 9306189 A	05-12-1996 15-03-1994 03-03-1994 21-06-1995 24-04-1995 21-05-1996 18-04-1995 25-09-1996 10-01-1995

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

# 8/9.26493

PCT/FR 00/01259

page 1 de 4

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



## C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
<p>(X) id RRP FR</p> <p>Y</p>	<p>page 20, alinéa 4 -page 21, alinéa 1</p> <p>FOMINAYA J ET AL: "Target cell-specific DNA transfer mediated by a chimeric multidomain protein. Novel non-viral gene delivery system." JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, (1996 MAY 3) 271 (18) 10560-8., <u>XP002133110</u> cité dans la demande</p> <p>page 10560</p> <p>abrégé page 10562; figure 1</p>	<p>1,12,14, 28-30, 32,36, 37, 40-42, 45, 47-50, 53-56, 58-63 2-11,13, 15-19, 26,27, 31, 33-35, 38,39, 51,52,57</p>
<p>X</p> <p>Y</p>	<p>WO 94 13325 A (MICROPROBE CORP) <i>nouveau</i> 1 23 juin 1994 (1994-06-23)</p> <p>page 4, ligne 19 -page 5, ligne 19</p> <p>page 7, ligne 17 -page 11, ligne 33 page 25, ligne 6 -page 26, ligne 26</p>	<p>20-25, 28,36, 37,40, 49,50, 53-56, 58-63 2-11,13, 15-19, 26,27, 31, 33-35, 38,39</p>
<p>(X)id RRP FR</p>	<p>CHAKRABARTI, M. ET AL: "Transfer of DNA into lymphoma cells by DNA-bound to T101-biotinylated -avidin- polylysine antibody complex." JOURNAL OF NUCLEAR MEDICINE, (1996) VOL. 37, NO. 5 SUPPL., PP. 62P. MEETING INFO.: 43RD ANNUAL MEETING OF THE SOCIETY OF NUCLEAR MEDICINE DENVER, COLORADO, USA JUNE 3-5, 1996, <u>XP002133111</u> abstract No. 237</p> <p>---</p> <p>-/--</p>	<p>14,28, 36,37, 40-44, 49,50, 53-56, 58-63</p>

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

## C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X ✓ id RRP FR	DATABASE MEDLINE 'en ligne! US NATIONAL LIBRARY OF MEDICINE (NLM), BETHESDA, MD, US; GUY J ET AL: "Delivery of DNA into mammalian cells by receptor-mediated endocytosis and gene therapy." retrieved from STN Database accession no. 96031841 <u>XP002133112</u> abrégé & MOLECULAR BIOTECHNOLOGY, (1995 JUN) 3 (3) 237-48. REF: 60,	14,28, 36,37, 40-46, 49,50, 53-56, 58-63
Y ✓	WO 88 08854 A (OOSTERWIJK EGBERT ;WARNAAR ✓ SVEN O (NL)) 17 novembre 1988 (1988-11-17) cité dans la demande page 2, alinéa 1 -page 3, alinéa 4	- id em 51,52,57 RRP FR -
en "Y" dans la RRP FR (A)	WO 95 21195 A (DONATO NICHOLAS J ;ROSENBLUM MICHAEL G (US); RES DEV FOUNDATION (U) 10 août 1995 (1995-08-10) page 3, ligne 26 -page 6, ligne 11	4 m doc que FR mais class? ≠
A	WO 98 56425 A (DUNCAN RUTH ;SATCHI RONIT (GB); UNIV LONDON PHARMACY (GB)) 17 décembre 1998 (1998-12-17) page 3, ligne 36 -page 4, ligne 12 page 7, ligne 17 -page 11, ligne 14	2 <u>nouveau</u> 2
A	WO 98 47538 A (WRASIDLO WOLFGANG ;LICHA KAI (DE); RIEFKE BJOERN (DE); DIAGNOSTIKF) 29 octobre 1998 (1998-10-29) revendications 1,8	<u>nouveau</u> 3 2
A	DATABASE BIOSIS 'en ligne! BIOSCIENCES INFORMATION SERVICE, PHILADELPHIA, PA, US; 1995 TRAUT ROBERT R ET AL: "Location and domain structure of Escherichia coli ribosomal protein L7/L12: Site specific cysteine cross-linking and attachment of fluorescent probes." Database accession no. PREV199698797154 <u>XP002155195</u> abrégé & BIOCHEMISTRY AND CELL BIOLOGY, vol. 73, no. 11-12, 1995, pages 949-958, ISSN: 0829-8211	3 <u>nouveau</u> 4
	---	
	-/--	

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

## C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	<p>DATABASE BIOSIS 'en ligne!  BIOSCIENCES INFORMATION SERVICE,  PHILADELPHIA, PA, US; 1990  HUCKETT B ET AL: "EVIDENCE FOR TARGETED  GENE TRANSFER BY RECEPTOR-MEDIATED  ENDOCYTOSIS STABLE EXPRESSION FOLLOWING  INSULIN-DIRECTED ENTRY OF NEO INTO HEPG2  CELLS"  Database accession no. PREV199090077976  XP002155196  abrégé  &amp; BIOCHEMICAL PHARMACOLOGY,  vol. 40, no. 2, 1990, pages 253-264,  ISSN: 0006-2952</p> <p>-----</p> <p>PONCET ET AL: "ANTIFECTION: AN  ANTIBODY-MEDIATED METHOD TO INTRODUCE  GENES INTO LYMPHOID CELLS IN VITRO AND IN  VIVO"  GENE THERAPY,  vol. 3, 1996, pages 731-738, XP000877306 ✓  cité dans la demande  page 736  page 5</p> <p>-----</p> <p>US 5 428 132/A (HIRSCH FRANCOIS ET AL)  27 juin 1995 (1995-06-27)  cité dans la demande  colonne 2 -colonne 4; exemple 1</p> <p>-----</p> <p>WO 98 02564 A (JOHN P ROBERTS RESEARCH  INST ;STRATHDEE CRAIG A (CA))  22 janvier 1998 (1998-01-22)  revendications 1,16,32,33,37,38</p> <p>-----</p> <p>US 5 166 320 A (WU GEORGE Y ET AL)  24 novembre 1992 (1992-11-24)  page 3, ligne 25 -page 4, ligne 51</p> <p>-----</p> <p>WO 94 04696 A (MILES INC)  3 mars 1994 (1994-03-03)  cité dans la demande  page 4, ligne 24 -page 8, ligne 18  figures 4-6</p>	<p>3</p> <p>3</p> <p>3</p> <p>39</p> <p>45,46</p>

(en "Y" dans  
le RRPFR)

(en "Y" dans  
le RRPFR)

(en "Y" dans  
le RRPFR)

(en "Y" dans  
le RRPFR)

nouveau 5

m doc mais class<sup>n</sup> ≠

m doc mais class<sup>2</sup> ≠

m doc mais class<sup>n</sup> ≠

m doc mais class<sup>2</sup>. 45,46 ≠

idem RR PCT.

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande internationale No

PCT/FR 00/01259

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
W0 9613599 A	09-05-1996	AU 695196 B AU 3926895 A EP 0789776 A JP 9511916 T NZ 295673 A	06-08-1998 23-05-1996 20-08-1997 02-12-1997 29-03-1999
W0 9413325 A	23-06-1994	US 5574142 A AU 6295394 A	12-11-1996 04-07-1994
W0 8808854 A	17-11-1988	EP 0366707 A	09-05-1990
W0 9521195 A	10-08-1995	AU 695564 B AU 1868795 A CN 1143374 A EP 0743958 A FI 963103 A JP 9508792 T NO 963283 A	13-08-1998 21-08-1995 19-02-1997 27-11-1996 01-10-1996 09-09-1997 06-08-1996
W0 9856425 A	17-12-1998	AU 8028298 A CN 1259875 T EP 0989864 A	30-12-1998 12-07-2000 05-04-2000
W0 9847538 A	29-10-1998	DE 19717904 A AU 7905798 A CN 1253507 T EP 0988060 A NO 995181 A	29-10-1998 13-11-1998 17-05-2000 29-03-2000 22-10-1999
US 5428132 A	27-06-1995	AUCUN	
W0 9802564 A	22-01-1998	AU 3332097 A	09-02-1998
US 5166320 A	24-11-1992	US 5635383 A US 5874297 A JP 2731844 B JP 63269985 A	03-06-1997 23-02-1999 25-03-1998 08-11-1988
W0 9404696 A	03-03-1994	AU 674026 B AU 5088593 A CA 2143308 A EP 0658210 A FI 950866 A JP 8504565 T NO 950726 A NZ 255870 A ZA 9306189 A	05-12-1996 15-03-1994 03-03-1994 21-06-1995 24-04-1995 21-05-1996 18-04-1995 25-09-1996 10-01-1995

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



## TRAITE DE COOPÉRATION EN MATIERE DE BREVETS

PCT

NOTIFICATION DE LA RECEPTION DE  
L'EXEMPLAIRE ORIGINAL

(règle 24.2.a) du PCT)

Expéditeur: le BUREAU INTERNATIONAL

Destinataire:

MARTIN, Jean-Jacques  
Cabinet Régimbeau  
26, avenue Kléber  
F-75116 Paris  
FRANCE

Date d'expédition (jour/mois/année) 19 juin 2000 (19.06.00)	NOTIFICATION IMPORTANTE
Référence du dossier du déposant ou du mandataire 340833/18162	Demande internationale no PCT/FR00/01259

Il est notifié au déposant que le Bureau international a reçu l'exemplaire original de la demande internationale précisée ci-après.

Nom(s) du ou des déposants et de l'Etat ou des Etats pour lesquels ils sont déposants:

CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE (CNRS) (pour tous les Etats  
désignés sauf US)

HIRSCH, François etc. (pour US seulement)

Date du dépôt international : 10 mai 2000 (10.05.00)

Date(s) de priorité revendiquée(s) : 10 mai 1999 (10.05.99)

Date de réception de l'exemplaire original  
par le Bureau international : 26 mai 2000 (26.05.00)

Liste des offices désignés :

AP : GH,GM,KE,LS,MW,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZW

EA : AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM

EP : AT,BE,CH,CY,DE,DK,ES,FI,FR,GB,GR,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE

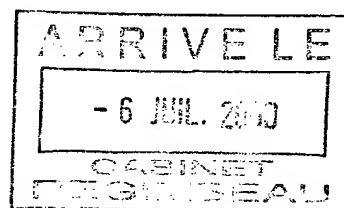
OA : BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG

National : AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,CA,CH,CN,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EE,ES,

FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,

MG,MK,MN,MW,MX,NO,NZ,PL,PT,RO,RU,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VN,

YU,ZA,ZW



Bureau international de l'OMPI  
34, chemin des Colombettes  
1211 Genève 20, Suisse

n° de télécopieur (41-22) 740.14.35

Fonctionnaire autorisé

Jocelyne Rey-Millet

n° de téléphone (41-22) 338.83.38

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

## Suite du formulaire PCT/IB/301

## NOTIFICATION DE LA RECEPTION DE L'EXEMPLAIRE ORIGINAL

Date d'expédition (jour/mois/année) 19 juin 2000 (19.06.00)	NOTIFICATION IMPORTANTE
Référence du dossier du déposant ou du mandataire 340833/18162	Demande internationale no PCT/FR00/01259

**ATTENTION**

Le déposant doit soigneusement vérifier les indications figurant dans la présente notification. En cas de divergence entre ces indications et celles que contient la demande internationale, il doit aviser immédiatement le Bureau international.

En outre, l'attention du déposant est appelée sur les renseignements donnés dans l'annexe en ce qui concerne

☒ les délais dans lesquels doit être abordée la phase nationale

☐ la confirmation des désignations faites par mesure de précaution

☐ les exigences relatives aux documents de priorité.

Une copie de la présente notification est envoyée à l'office récepteur et à l'administration chargée de la recherche internationale.

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

## RENSEIGNEMENTS CONCERNANT LES DELAIS DANS LESQUELS DOIT ETRE ABORDEE LA PHASE NATIONALE

Il est rappelé au déposant qu'il doit aborder la "phase nationale" auprès de chacun des offices désignés indiqués sur la notification de la réception de l'exemplaire original (formulaire PCT/IB/301) en payant les taxes nationales et en remettant les traductions, telles qu'elles sont prescrites par les législations nationales.

Le délai d'accomplissement de ces actes de procédure est de **20 MOIS** à compter de la date de priorité ou, pour les Etats désignés qui ont été élus par le déposant dans une demande d'examen préliminaire international ou dans une élection ultérieure, de **30 MOIS** à compter de la date de priorité, à condition que cette élection ait été effectuée avant l'expiration du 19<sup>e</sup> mois à compter de la date de priorité. Certains offices désignés (ou élus) ont fixé des délais qui expirent au-delà de 20 ou 30 mois à compter de la date de priorité. D'autres offices accordent une prolongation des délais ou un délai de grâce, dans certains cas moyennant le paiement d'une taxe supplémentaire.

En plus de ces actes de procédure, le déposant devra dans certains cas satisfaire à d'autres exigences particulières applicables dans certains offices. **Il appartient au déposant** de veiller à remplir en temps voulu les conditions requises pour l'ouverture de la phase nationale. La majorité des offices désignés n'envoient pas de rappel à l'approche de la date limite pour aborder la phase nationale.

**Des informations détaillées concernant les actes de procédure à accomplir pour aborder la phase nationale auprès de chaque office désigné, les délais applicables et la possibilité d'obtenir une prolongation des délais ou un délai de grâce et toutes autres conditions applicables figurent dans le volume II du Guide du déposant du PCT. Les exigences concernant le dépôt d'une demande d'examen préliminaire international sont exposées dans le chapitre IX du volume I du Guide du déposant du PCT.**

GR et ES sont devenues liées par le chapitre II du PCT le 7 septembre 1996 et le 6 septembre 1997, respectivement, et peuvent donc être élues dans une demande d'examen préliminaire international ou dans une élection ultérieure présentée le 7 septembre 1996 (ou à une date postérieure) ou le 6 septembre 1997 (ou à une date postérieure), respectivement, quelle que soit la date de dépôt de la demande internationale (voir le second paragraphe, ci-dessus).

Veuillez noter que seul un déposant qui est ressortissant d'un Etat contractant du PCT lié par le chapitre II ou qui y a son domicile peut présenter une demande d'examen préliminaire international.

## CONFIRMATION DES DESIGNATIONS FAITES PAR MESURE DE PRECAUTION

Seules les désignations expresses faites dans la requête conformément à la règle 4.9.a) figurent dans la présente notification. Il est important de vérifier si ces désignations ont été faites correctement. Des erreurs dans les désignations peuvent être corrigées lorsque des désignations ont été faites par mesure de précaution en vertu de la règle 4.9.b). Toute désignation ainsi faite peut être confirmée conformément aux dispositions de la règle 4.9.c) avant l'expiration d'un délai de 15 mois à compter de la date de priorité. En l'absence de confirmation, une désignation faite par mesure de précaution sera considérée comme retirée par le déposant. Il ne sera adressé aucun rappel ni invitation. Pour confirmer une désignation, il faut déposer une déclaration précisant l'Etat désigné concerné (avec l'indication de la forme de protection ou de traitement souhaitée) et payer les taxes de désignation et de confirmation. La confirmation doit parvenir à l'office récepteur dans le délai de 15 mois.

## EXIGENCES RELATIVES AUX DOCUMENTS DE PRIORITE

Pour les déposants qui n'ont pas encore satisfait aux exigences relatives aux documents de priorité, il est rappelé ce qui suit.

Lorsque la priorité d'une demande nationale, régionale ou internationale antérieure est revendiquée, le déposant doit présenter une copie de cette demande antérieure, certifiée conforme par l'administration auprès de laquelle elle a été déposée ("document de priorité"), à l'office récepteur (qui la transmettra au Bureau international) ou directement au Bureau international, avant l'expiration d'un délai de 16 mois à compter de la date de priorité, étant entendu que tout document de priorité peut être présenté au Bureau international avant la date de publication de la demande internationale, auquel cas ce document sera réputé avoir été reçu par le Bureau international le dernier jour du délai de 16 mois (règle 17.1.a)).

Lorsque le document de priorité est délivré par l'office récepteur, le déposant peut, au lieu de présenter ce document, demander à l'office récepteur de le préparer et de le transmettre au Bureau international. La requête à cet effet doit être formulée avant l'expiration du délai de 16 mois et peut être soumise au paiement d'une taxe (règle 17.1.b)).

Si le document de priorité en question n'est pas fourni au Bureau international, ou si la demande adressée à l'office récepteur de préparer et de transmettre le document de priorité n'a pas été faite (et la taxe correspondante acquittée, le cas échéant) avant l'expiration du délai applicable mentionné aux paragraphes précédents, tout Etat désigné peut ne pas tenir compte de la revendication de priorité; toutefois, aucun office désigné ne peut décider de ne pas tenir compte de la revendication de priorité avant d'avoir donné au déposant la possibilité de remettre le document de priorité dans un délai raisonnable en l'espèce.

Lorsque plusieurs priorités sont revendiquées, la date de priorité à prendre en considération aux fins du calcul du délai de 16 mois est la date du dépôt de la demande la plus ancienne dont la priorité est revendiquée.

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

## TRAITE DE COOPÉRATION EN MATIÈRE DE BREVETS

PCT

NOTIFICATION RELATIVE  
A LA PRESENTATION OU A LA TRANSMISSION  
DU DOCUMENT DE PRIORITE

(instruction administrative 411 du PCT)

Expéditeur : le BUREAU INTERNATIONAL

Destinataire:

MARTIN, Jean-Jacques  
Cabinet Régimbeau  
26, avenue Kléber  
F-75116 Paris  
FRANCE

Date d'expédition (jour/mois/année) 19 juin 2000 (19.06.00)	NOTIFICATION IMPORTANTE
Référence du dossier du déposant ou du mandataire 340833/18162	
Demande internationale no PCT/FR00/01259	Date du dépôt international (jour/mois/année) 10 mai 2000 (10.05.00)
Date de publication internationale (jour/mois/année) Pas encore publiée	Date de priorité (jour/mois/année) 10 mai 1999 (10.05.99)
Déposant CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE (CNRS) etc	

- La date de réception (sauf lorsque les lettres "NR" figurent dans la colonne de droite) par le Bureau international du ou des documents de priorité correspondant à la ou aux demandes énumérées ci-après est notifiée au déposant. Sauf indication contraire consistant en un astérisque figurant à côté d'une date de réception, ou les lettres "NR", dans la colonne de droite, le document de priorité en question a été présenté ou transmis au Bureau international d'une manière conforme à la règle 17.1.a) ou b).
- Ce formulaire met à jour et remplace toute notification relative à la présentation ou à la transmission du document de priorité qui a été envoyée précédemment.
- Un **astérisque(\*)** figurant à côté d'une date de réception dans la colonne de droite signale un document de priorité présenté ou transmis au Bureau international mais de manière non conforme à la règle 17.1.a) ou b). Dans ce cas, **l'attention du déposant est appelée** sur la règle 17.1.c) qui stipule qu'aucun office désigné ne peut décider de ne pas tenir compte de la revendication de priorité avant d'avoir donné au déposant la possibilité de remettre le document de priorité dans un délai raisonnable en l'espèce.
- Les lettres "NR" figurant dans la colonne de droite signalent un document de priorité que le Bureau international n'a pas reçu ou que le déposant n'a pas demandé à l'office récepteur de préparer et de transmettre au Bureau international, conformément à la règle 17.1.a) ou b), respectivement. Dans ce cas, **l'attention du déposant est appelée** sur la règle 17.1.c) qui stipule qu'aucun office désigné ne peut décider de ne pas tenir compte de la revendication de priorité avant d'avoir donné au déposant la possibilité de remettre le document de priorité dans un délai raisonnable en l'espèce.

<u>Date de priorité</u>	<u>Demande de priorité n°</u>	<u>Pays, office régional ou office récepteur selon le PCT</u>	<u>Date de réception du document de priorité</u>
10 mai 1999 (10.05.99)	99/05943	FR	26 mai 2000 (26.05.00)

Bureau international de l'OMPI  
34, chemin des Colombettes  
1211 Genève 20, Suisse

no de télécopieur (41-22) 740.14.35

Fonctionnaire autorisé:

Jocelyne Rey-Millét 

no de téléphone (41-22) 338.83.38

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



PATENT COOPERATION TREATY

PCT

NOTICE INFORMING THE APPLICANT OF THE  
COMMUNICATION OF THE INTERNATIONAL  
APPLICATION TO THE DESIGNATED OFFICES

(PCT Rule 47.1(c), first sentence)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

MARTIN, Jean-Jacques  
Cabinet Régimbeau  
26, avenue Kléber  
F-75116 Paris  
FRANCE

[stamp]

Date of mailing (day/month/year) 16 November 2000 (16.11.00)		IMPORTANT NOTICE	
Applicant's or agent's file reference 340833/18162			
International application No. PCT/FR00/01259	International filing date (day/month/year) 10 May 2000 (10.05.00)	Priority date (day/month/year) 10 May 1999 (10.05.99)	
Applicant CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE (CNRS) etc			

1. Notice is hereby given that the International Bureau has communicated, as provided in Article 20, the international application to the following designated Offices on the date indicated above as the date of mailing of this Notice:  
AG,AU,DZ,KP,KR,US

In accordance with Rule 47.1(c), third sentence, each designated Office will accept the present Notice as conclusive evidence that the communication of the international application has duly taken place on the date of mailing indicated above and no copy of the international application is required to be furnished by the applicant to the designated Office(s).

2. The following designated Offices have waived their requirement whereby this communication must take place by that date:  
AE,AL,AM,AP,AT,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,CA,CH,CN,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,EA,EE,EP,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,NO,NZ,OA,PL,PT,RO,RU,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TR,TT,TZ,UA,UG,UZ,VN,YU,ZA,ZW  
Communication will take place only when requested by these Offices. Moreover, the applicant is not required to furnish a copy of the international application to the Offices in question (Rule 49.1(a-bis)).

3. Enclosed with this Notice is a copy of the international application as published by the International Bureau on

16 November 2000 (16.11.00) under No. WO 00/67697

REMINDER REGARDING CHAPTER 11 (Article 31.2)(a) and Rule 54.2)

If the applicant wishes to postpone entry into the national phase until 30 months (or later in some Offices) from the priority date, a **demand for international preliminary examination** must be filed with the competent International Preliminary Examining Authority before the expiration of 19 months from the priority date.

It is the applicant's sole responsibility to monitor the 19-month time limit.

Note that only an applicant who is a national or resident of a PCT Contracting State which is bound by Chapter II has the right to file a demand for international preliminary examination.

REMINDER REGARDING ENTRY INTO THE NATIONAL PHASE (Article 22 or 39(1))

If the applicant wishes to proceed with the international application in the **national phase**, he must, within 20 months or 30 months, or later in some Offices, perform the acts referred to therein before each designated or elected Office.

For further important information on the time limits and acts to be performed for entering the national phase, see the Annex to Form PCT/IB/301 (Notification of Receipt of Record Copy) and Volume II of the PCT Applicant's Guide.

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland	Authorized officer:  J. Zahra
Facsimile No. (41-22) 740.14.35	Telephone No. (41-22) 338.338.83.38

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

## INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

<b>(51) International patent classification<sup>7</sup>:</b>  A61K	A2	<b>(11) International publication number:</b> WO 00/67697  <b>(43) International publication date:</b> 16 November 2000 (16.11.00)
<b>(21) International application number:</b> PCT/FR00/01259  <b>(22) International filing date:</b> 10 May 2000 (10.05.00)  <b>(30) Data relating to the priority:</b> 99/05,943 10 May 1999 (10.05.99) FR  <b>(71) Applicant (for all designated States except US):</b> CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE (CNRS) [FR/FR]; 3, rue Michel- Ange, F-75794 Paris Cedex 16 (FR).  <b>(72) Inventors; and</b> <b>(75) Inventors/Applicants (US only):</b> HIRSCH, François [FR/FR]; 20, rue Victor Carmignac, F-94110 Arcueil (FR). DURRBACH, Antoine [FR/FR]; 1, rue des Champs, F-94170 Le Perreux (FR).  <b>(74) Representatives:</b> MARTIN, Jean-Jacques etc.; Cabinet Régimbeau, 26, avenue Kléber, F-75116 Paris (FR).		<b>(81) Designated states:</b> AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, ARIPO Patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).  <b>Published</b> <i>Without the International Search Report and to be republished once the report has been received.</i>
As printed		
<b>(54) Title:</b> NUCLEIC ACID-ANTIBODY CONJUGATE FOR DELIVERING A FOREIGN NUCLEIC ACID IN CELLS <b>(54) Titre:</b> CONJUGUE ACIDE NUCLEIQUE-ANTICORPS POUR DELIVRER UN ACIDE NUCLEIQUE ETRANGER DANS LES CELLULES  <b>(57) Abstract</b> <p>The invention concerns the techniques related to the insertion of foreign nucleic acid in cells. More particularly it concerns a DNA/antibody conjugate enabling an efficient foreign DNA expression <i>in vivo</i> or <i>in vitro</i> in protein form in target cells.</p> <b>(57) Abrégé</b> <p>La présente invention concerne les techniques relatives à l'introduction d'acide nucléique étranger dans des cellules. Plus particulièrement, la présente invention concerne un conjugué ADN/anticorps permettant l'expression efficace d'ADN étranger sous forme protéique dans des cellules cibles <i>in vivo</i> ou <i>in vitro</i>.</p>		

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

# PATENT COOPERATION TREATY

## PCT

### INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or Agent's file reference 340833/18162	<b>FOR FURTHER ACTION</b>	See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)
International application No. PCT/FR00/01259	International filing date (day/month/year) 10/05/2000	Priority date (day/month/year) 10/05/1999
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC C12N15/87		
Applicant CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SC.... et al.		

1.	This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.
2.	<p>This REPORT consists of a total of 14 sheets including this title page.</p> <p><input type="checkbox"/> This report is also accompanied by ANNEXES, i.e. sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Instruction 607 of Administrative Instructions of the PCT).</p> <p>These annexes consist of a total of                sheets.</p>
3.	<p>This report contains indications relating to the following items:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>I    <input checked="" type="checkbox"/> Basis of the report</li> <li>II   <input checked="" type="checkbox"/> Priority</li> <li>III   <input type="checkbox"/> Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability</li> <li>IV   <input checked="" type="checkbox"/> Lack of unity of invention</li> <li>V    <input checked="" type="checkbox"/> Reasoned statement according to Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement</li> <li>VI   <input type="checkbox"/> Certain documents cited</li> <li>VII   <input type="checkbox"/> Certain defects in the international application</li> <li>VIII   <input checked="" type="checkbox"/> Certain observations on the international application</li> </ul>

Date of submission of the demand 04/12/2000	Date of completion of this report 23.08.2001
<p><b>Name and mailing address of the IPEA/</b></p> <div style="display: flex; align-items: center;"> <div> <p>European Patent Office D-80298 Munich Tel. +49 89 2399 - 0, Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4465</p> </div> </div>	<p><b>Authorized officer:</b></p> <p>Mundel, C</p> <p>Telephone No. +49 89 2399 7314</p> <div style="text-align: right;"> </div>

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

**INTERNATIONAL PRELIMINARY  
EXAMINATION REPORT**

International application No. PCT/FR00/01259

**I. Basis of the report**

1. This report has been drawn up on the basis of the following elements *(the replacement sheets received by the receiving office in response to an invitation according to Article 14 are considered in the present report as "originally filed" and are not annexed to the report as they contain no amendments (Rules 70.16 and 70.17).)*:

**Description, pages:**

1-29 as originally filed

**Claims, No.:**

1-63 as originally filed

**Drawings, sheets:**

1/7-7/7 as originally filed

2. With regard to the **language**, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which the international application was filed, unless otherwise indicated under this item.

These elements were available or furnished to this Authority in the following language which is:

- ☐ the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rule 23.1(b)).
- ☐ the language of publication of the international application (under Rule 48.3(b)).
- ☐ the language of the translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rule 55.2 and/or 55.3).

3. With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, the international preliminary examination was carried out on the basis of the sequence listing:

- ☐ contained in the international application in written form.
- ☐ filed together with the international application in computer readable form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in written form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in computer readable form.
- ☐ The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.
- ☐ The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.

4. The amendments have resulted in the cancellation of:

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



**INTERNATIONAL PRELIMINARY  
EXAMINATION REPORT**

International application No. PCT/FR00/01259

- ☐ the description, pages:
- ☐ the claims, Nos.:
- ☐ the drawings, sheets/fig:

5. ☐ This report has been written disregarding (some of) the amendments, which were considered as going beyond the description of the invention, as filed, as is indicated below (Rule 70.2(c)):

*(All replacement sheets comprising amendments of this nature should be indicated in point 1 and attached to this report).*

6. Additional observations, if necessary:

**II. Priority**

1. ☐ This report has been established as if no priority had been claimed due to the failure to furnish within the prescribed time limit the requested:
- ☐ copy of the earlier application whose priority has been claimed
  - ☐ translation of the earlier application whose priority has been claimed.
2. ☐ This report has been established as if no priority had been claimed due to the fact that the priority claim has been found invalid.

Thus for the purposes of this report, the international filing date indicated above is considered to be the relevant date.

3. Additional observations, if necessary:  
**see separate sheet**

**IV. Lack of unity of invention**

1. In response to the invitation to restrict or pay additional fees the applicant has:

- ☐ restricted the claims.
- ☐ paid additional fees.
- ☐ paid additional fees under protest.
- ☐ neither restricted nor paid additional fees.

2. ☒ This Authority found that the requirement of unity of invention is not complied with and chose, according to Rule 68.1, not to invite the applicant to restrict the claims or pay additional fees.

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

**INTERNATIONAL PRELIMINARY  
EXAMINATION REPORT**

International application No. PCT/FR00/01259

3. This Authority found that, according to Rules 13.1, 13.2 and 13.3:

- ☐ the requirement of unity of invention is complied with.
- ☒ the requirement of unity of invention is not complied with, for the following reasons:  
**see separate sheet**

4. Consequently, the following parts of the international application were the subject of international preliminary examination in establishing this report:

- ☒ all parts.
- ☐ the parts relating to claims Nos.

**V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement**

1. Statement

Novelty	Yes:	Claims	2-13, 15-19, 21-35, 39, 45-48 and 51-52
	No:	Claims	1, 14, 20, 36-38, 40-44, 49-50 and 53-63
Inventive Step	Yes:	Claims	
	No:	Claims	1-63
Industrial Applicability	Yes:	Claims	1-63
	No:	Claims	

2. Citations and explanations  
**see separate sheet**

**VIII. Certain observations in the international application**

The following observations on the clarity of the claims, descriptions, and drawings or on the question whether the claims are fully supported by the description, are made:  
**see separate sheet**

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

---

**With regard to point II**

**Priority**

The Applicant's attention is drawn to the fact that the priority document of the present application does not make reference to the use of a "peptide which can be cleaved by at least one glycolytic and/or proteolytic enzyme". All the claims which make reference to a conjugate comprising such a peptide do not therefore benefit from the priority of 05.10.99.

**With regard to point IV**

**Lack of unity of the invention**

According to Rule 13 PCT, an international application can only relate to an invention or to a plurality of inventions related to one another such that they form only one general inventive concept, i.e. a plurality of inventions having at least one common technical characteristic which determines a contribution compared to the state of the art.

The International Preliminary Examination Authority (IPEA) has identified the following groups in the present application:

- A. Claims 1 and 29 (completely) and 2-13, 26-33, 36-63 (partially) make reference to conjugates for transferring a nucleic acid molecule, characterized in that they comprise a nucleic acid molecule, a translocation domain and an antibody specific for a surface antigen of said cell and, optionally, a peptide which can be cleaved with at least one glycolytic and/or proteolytic enzyme and/or a molecule of the avidin type and/or a nucleic acid-binding molecule.
- B. Claims 14 (completely) and 9-13, 15-19, 24-28, 30-63 (partially) make reference to conjugates for transferring a nucleic acid molecule into a cell, characterized in that they comprise a nucleic acid molecule, an antibody specific for a cell surface antigen and a nucleic acid-binding molecule and, optionally, a peptide which can be cleaved with at least one glycolytic and/or proteolytic enzyme and/or a molecule of the avidin type.
- C. Claims 20-23 (completely) and 2-3, 5-11, 13, 15-28, 31, 33-63 (partially) make reference to conjugates for transferring a nucleic molecule into a cell, characterized in that they comprise a nucleic acid molecule, an antibody specific for a cell surface antigen and a peptide which can be cleaved with at least one glycolytic and/or proteolytic enzyme and, optionally, a molecule of

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

the avidin type and/or a nucleic acid-binding molecule and/or a translocation domain.

The only common concept connecting the various groups mentioned above is a conjugate for transferring a nucleic acid molecule into a cell, characterized in that it comprises a nucleic acid molecule, an antibody specific for a cell surface antigen and at least one other molecule. Since this common concept is neither novel (see point V-3) nor inventive (see point V-4), the various groups mentioned above represent independent inventions.

**With regard to point V**

**Reasoned statement according to Rule 66.2(a)(ii) regarding the novelty, inventive step and industrial applicability; citations and explanations supporting such statement**

1. The present application makes reference to conjugates for transferring a nucleic acid molecule into a cell, characterized in that they comprise a nucleic acid molecule, an antibody specific for a surface antigen of said cell and at least one other molecule chosen from: a translocation domain, a nucleic acid-binding molecule or a peptide which can be cleaved by a glycolytic and/or proteolytic enzyme. The application also makes reference to the use of conjugates for manufacturing medicinal products.
2. **Reference is made to the following documents:**
  - D1: WO 96 13599 A (WELS WINFRIED; FOMINAYA JESUS (CH)) May 9, 1996 (1996-05-09) cited in the application
  - D2: FOMINAYA J ET AL: 'Target cell-specific DNA transfer mediated by a chimeric multidomain protein. Novel non-viral gene delivery system.' JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, (MAY 3, 1996) 271 (18) 10560-8, cited in the application
  - D3: WO 94 13325 A (MICROPROBE CORP) June 23, 1994 (1994-06-23)
  - D4: CHAKRABARTI, M. ET AL: 'Transfer of DNA into lymphoma cells by DNA-bound to T101-biotinylated-avidin-polylysine antibody complex.' JOURNAL OF NUCLEAR MEDICINE, (1996) VOL. 37, NO. 5 SUPPL., PP. 62P. MEETING INFO.: 43RD ANNUAL MEETING OF THE SOCIETY OF NUCLEAR MEDICINE DENVER, COLORADO, USA JUNE 3-5, 1996.

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



### 3. Lack of novelty; Article 33(2) PCT

3.1 Document D1 describes a system for transferring nucleic acids, comprising a toxin translocation domain, for targeting a nucleic acid into a specific cell and for obtaining the expression of said nucleic acid (Abstract). The system described in D1 comprises a multidomain protein and a nucleic acid. The multidomain protein of D1 comprises a target cell-specific binding or ligand domain, a translocation domain which allows the effector nucleic acid to escape endocytic vesicles, a nucleic acid-binding domain which recognizes and binds with high affinity to a defined structure of the effector nucleic acid (p. 4, last 10 lines and p. 5, lines 29-33). The protein may also comprise an endoplasmic reticulum retention signal and a nuclear localization signal (p. 5, lines 1-3 and lines 29-33). The translocation domain used in the multidomain protein can be derived from bacterial toxins (p. 5, line 20 and p. 10, lines 9-11). The target cell-binding domain can be an antibody (p. 7, lines 10-11), and more preferably the single chain antigen-binding domain of an antibody (p. 8, line 7) preferably directed against an antigen, the expression of which is increased or specific at the surface of tumor cells compared to normal cells (p. 8, lines 20-21). The nucleic acid-binding domain can be an RNA-binding domain or, more preferably, a DNA-binding domain (p. 10, lines 23-25). An example of a preferred multidomain protein is given on p. 11, second paragraph. D1 also gives examples of proteins encoded by the nucleic acid molecule to be introduced in the case of use in the treatment of tumor cells (p. 20, lines 7-11). The system described in D1 can be used for the prevention, stabilization or reversion of diseases such as AIDS, diabetes, Alzheimer's disease or cardiac problems, and also the treatment of cancers (p. 20, lines 29-35). In the case of the treatment of cancers, the use of antisense constructs in order to block the expression of the oncogene is mentioned (p. 20, lines 32-33). The use of polycations, of protamine or of histones is also discussed (p. 20, line 35 to p. 21, line 4).

The subject matter of claims 1, 14, 36-38, 40, 49-50 and 53-63 cannot be considered to be novel with respect to the teaching of D1 (Article 33(2) PCT).

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

- 3.2 Document D2 is a publication corresponding to the patent application D1 and contains approximately the same information as D1.

The subject matter of claims 1, 14, 36-38, 40, 49-50 and 53-63 cannot therefore be considered to be novel with respect to the teaching of D2 (Article 33(2) PCT).

- 3.3 Document D3 describes a conjugate comprising avidin, polylysine attached to avidin via a covalent bond, a biotinylated monoclonal antibody attached to the avidin via biotin and the DNA of the plasmid pGL2 attached via noncovalent attachment to the polylysine. This conjugate was used for transfecting CCRF-CEM cells.

The subject matter of claims 14, 36-37, 41-44 and 49-50 cannot therefore be considered to be novel compared to the teaching of D3 (Article 33(2) PCT).

- 3.4 Document D4 describes a conjugate comprising an oligonucleotide (ODN) attached to a peptide which can be cleaved by a proteolytic enzyme. This peptide is, in turn, covalently attached to a "carrier" or to a ligand for targeting into a specific cell (Abstract). D4 indicates that the ODNs comprise between 5 and 100 nucleotides and may be antisense oligonucleotides (p. 1, lines 3-10). The ODNs according to document D4 are therapeutic ODNs (p. 6, lines 22-33). The "carriers" are divided into three categories, the third of which comprises antibodies (p. 9, line 15). Figure 4 of document D4 illustrates 3 classes of conjugates. The conjugates of the third class use ligands which bind specifically to receptors (p. 16, lines 29-30). These conjugates can be obtained by two methods (p. 17, lines 11-19) and the method B illustrated in Figure 4 shows an ODN-peptide which can be cleaved by a proteolytic enzyme-monoclonal antibody conjugate (Fig. 4 and p. 17, lines 16-19).

The subject matter of claims 20, 36-37, 40, 49-50 and 53-63 cannot therefore be considered to be novel with respect to the teaching of D4 (Article 33(2) PCT).

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

3.5 The subject matter of claims 2-13, 15-19, 21-35, 39, 45-48 and 51-52 has never been described in the documents cited in the International Search Report (ISR). Claims 2-13, 15-19, 21-35, 39, 45-48 and 51-52 are therefore considered to be novel within the meaning of Article 33(2) PCT.

#### **4. Lack of inventiveness; Article 33(3) PCT**

The most relevant document for assessing the inventiveness of the claims is document D1 (see point VIII-3.1 for the content).

The conjugates described in D1 comprise:

- a nucleic acid molecule,
- an antibody domain specific for a surface antigen of a cell,
- a translocation domain,
- a molecule for interaction with nucleic acids,

which have been described as important domains in the present application. Most of the conjugates of the present application differ from the compounds described in D1 only by the nature of the bond between the various components of the conjugate. In the conjugates of document D1, the various functional domains, with the exception of the nucleic acid molecule, are attached via peptide bonds within a multidomain protein. In the present application, the various domains are attached via bridging agents, a molecule of the avidin type or a "chemical" covalent bond.

The use of bridging agents or of covalent bonds in order to attach biological molecules and, more particularly, polypeptides is well known to those skilled in the art and cannot therefore be considered to be inventive. Similarly, the advantage of the avidin molecule – which has a high affinity for biotin – as a molecule for attachment between various polypeptides was well known to those skilled in the art and its use in the domain of conjugates for transferring nucleic acid molecules into cells has already been described (see, for example, document D3). The use of avidin molecules as bridging molecules cannot therefore be considered to be inventive.

Another difference between the conjugates described in D1 and the conjugates of the present application is the presence of a peptide which can be cleaved by at least one glycolytic and/or proteolytic enzyme. The use of

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

cleavable peptides is well known to those skilled in the art and its application in the domain of conjugates for transferring nucleic acid molecules into cells has already been described (see, for example, document D4). The use of cleavable peptides in the compounds of the present application cannot therefore be considered to be inventive.

The subject matter of claims 1-63 cannot therefore be considered to be inventive (Article 33(3) PCT).

**With regard to point VIII**

**Observations relating to the international application**

**Lack of clarity; Article 6 PCT**

1. Claim 1 of the present application lacks clarity for the following reasons:
  - (i) No indication is given regarding the way in which the various components: nucleic acid molecule, translocation domain and specific antibody, should be conjugated. The IPEA considers that not all possible combinations will have the effect described for the compounds of the present application and that those skilled in the art, faced with the large choice of conjugation possibilities, will not be able to identify those such that "said conjugate is transfected effectively into said cell" without an excessive amount of experimental work (Article 5 PCT in combination with Article 6 PCT).
  - (ii) The expression "translocation domain" is vague, which is detrimental to the clarity of the claim. Even though this term is defined in the description of the present application, the Applicant's attention is drawn to the fact that, according to the PCT Gazette of 10.29.98 "Directives concerning the international preliminary examination according to the PCT", chapter III-4.2, a claim must be written "(...) in such a way that its meaning clearly emerges from its very text".  
This comment is also valid for claims 2, 5, 6, 8, 9, 11-13, 26-27, 31-33 and 47.
  - (iii) The expression "bridging agent" is vague, which is detrimental to the clarity of the claim.  
This comment is also valid for claims 3-4, 6, 9, 12-13, 18, 23-24 and 27.

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



2. Claim 2 makes reference to a conjugate as claimed in claim 1, characterized in that it also comprises a peptide which can be cleaved, inter alia, by a glycolytic enzyme. It is not clear to the IPEA which type of peptide can be cleaved with a glycolytic enzyme.  
This comment is also valid for claims 13, 15 and 20.
3. In claim 3 of the present application, the expression "preferably" is used. The Applicant's attention is drawn to the fact that, according to the PCT Gazette of 10.29.98 "Directives concerning the international preliminary examination according to the PCT", chapter III-4.6: expressions such as "in particular", "preferably", "for example", "such that" or "more particularly" "have no limiting effect on the scope of a claim; in other words, the characteristic which follows such an expression must be considered to be entirely optional".  
This comment is also valid for claims 4, 16, 17 and 22.
4. Claim 4 of the present application makes reference to a "molecule of the avidin type". The use of this vague expression is detrimental to the clarity of the claim. The Applicant's attention is drawn to the fact that, even though this expression is defined in the description of the present application, according to the PCT Gazette of 10.29.98 "Directives concerning the international preliminary examination according to the PCT", chapter III-4.2, a claim must be written "(...) in such a way that its meaning clearly emerges from its very text".  
This comment is also valid for claims 12-13, 17, 22, 30-31 and 34.
5. Claim 9 makes reference to a "nucleic acid-binding molecule". This expression is vague and is detrimental to the clarity of the claim. The Applicant's attention is drawn to the fact that, even though this expression is defined in the description of the present invention, according to the PCT Gazette of 10.29.98 "Directives concerning the international preliminary examination according to the PCT", chapter III-4.2, a claim must be written "(...) in such as way that its meaning clearly emerges from its very text".  
This comment is also valid for claims 11-15, 18, 24, 27, 32, 34 and 41.  
This comment also applies to claim 42, but regarding a "nucleic acid-binding protein".
6. Claim 14 makes reference to a conjugate for transferring a nucleic acid molecule, characterized in that it comprises: a nucleic acid molecule, an

THIS PAGE BLANK (USPTO)

antibody specific for a cell surface antigen and a nucleic acid-binding molecule. The Applicant's attention is drawn to the fact that the formulation of claim 14 does not imply any attachment between the various compounds. In its broadest sense, this claim may comprise a mixture of the three components mentioned. For the correction of claim 14, the Applicant's attention is also drawn to the comments in point VIII-1.

This comment is also valid for claim 20.

7. In claim 37, double-stranded DNA or single-stranded RNA are described in that they encode "a protein product of interest which is expressed effectively in the cell". This expression is vague and is detrimental to the clarity of this claim. In addition, the protein product of interest is characterized in that it "is expressed effectively in the cell", i.e. by the result sought for said protein product of interest. According to the PCT Gazette of 10.29.98 "Directives concerning the international preliminary examination according to the PCT", chapter III-4.7: "The field defined by the claims must be as precise as the invention allows. As a general rule, claims which attempt to define the invention or one of its characteristics by the result sought should not be accepted".
8. In claim 38, the protein product must be chosen from a group composed, inter alia, of "killer genes" and "genes which makes it possible to lift chemoresistance". This claim lacks clarity for the following reasons:
  - (i) A protein product cannot be a gene.
  - (ii) There is no definition of what "killer genes" or "genes which make it possible to lift chemoresistance" may be, which is detrimental to the clarity of the claim. The Applicant's attention is drawn to the fact that, even though these expressions are defined in the description of the present application, according to the PCT Gazette of 10.29.98 "Directives concerning the international preliminary examination according to the PCT", chapter III-4.2, a claim must be written "(...) in such a way that its meaning clearly emerges from its very text".
  - (iii) Claim 38 makes reference to a conjugate as claimed in claim 35, characterized in that said product of interest (...). The Applicant's attention is drawn to the fact that claim 35 does not make reference to a product of interest. The dependency of claim 38 should therefore be verified.

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

9. Claim 43 makes reference to polycationic polymers. The definition of what is a "free polycation" is not clear to the IPEA.
10. In claim 48, the translocation domain is characterized in that it is a fragment of Haemophilus A hemagglutinin. In this claim, no delimitation and/or sequence is given for said fragment, which is detrimental to the clarity of the claim.
11. Claim 58 makes reference to a conjugate as a medicinal product intended to transfer a nucleic acid molecule into a cell, characterized in that said cell is brought into contact with said conjugate so as to transfect said cell with said conjugate. The Applicant's attention is drawn to the fact that the characterizing component of this claim is a step of method, which introduces a doubt regarding the category of claim 58.  
According to the PCT Gazette of 10.29.98 "Directives concerning the international preliminary examination according to the PCT", chapter III-4.1:  
"Given the differences in scope of protection which may ensue from the various categories of claims, the Examiner must draw attention to any wording of a claim which leaves a doubt regarding its category".  
This comment is also valid for claims 59-62.

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**